



Departamento de Microbiología y Parasitología  
Instituto de Acuicultura-Facultad de Biología  
Universidad de Santiago de Compostela

Caracterización genética de factores de  
virulencia en *Photobacterium damsela*:  
bases moleculares de la actividad hemolítica

Memoria que presenta  
**Amable José Rivas Fontenla**  
Para optar al grado de Doctor en Biología  
Santiago de Compostela 2012



**Manuel L. Lemos Ramos**, Catedrático del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela, y

**Carlos Rodríguez Osorio**, Profesor Titular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela,

**INFORMAN:** Que la presente Tesis Doctoral titulada “Caracterización genética de factores de virulencia en *Photobacterium damsela*: bases moleculares de la actividad hemolítica” que presenta **D. Amable José Rivas Fontenla** para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura, de la Universidad de Santiago de Compostela, y considerando que se halla concluida autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos el presente informe en Santiago de Compostela a 11 de mayo de 2012.

Fdo.: Dr. Manuel L. Lemos Ramos

Fdo.: Dr. Carlos Rodríguez Osorio

El doctorando,

Fdo.: Amable José Rivas Fontenla



El trabajo descrito en la presente memoria ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación con los proyectos AGL2006-00697 y AGL2009-12266-C02-01, y por la Xunta de Galicia con el proyecto INCITE08PXIB235028PR.

Durante su realización se ha disfrutado de una Beca de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia e Innovación



## RESUMEN

La bacteria marina *Photobacterium damsela* comprende dos subespecies, la subsp. *piscicida* y la subsp. *damsela*. Ambas subespecies presentan características fenotípicas claramente diferenciales. Dichas diferencias abarcan desde diferentes temperaturas de crecimiento o rango de hospedadores hasta una gran variabilidad en la composición de los productos extracelulares. Todas las cepas de *P. damsela* producen sideróforos, y la naturaleza química de los mismos difiere en las dos subespecies. Aunque no hemos podido descifrar la base genética que se esconde tras estos sistemas, sí hemos encontrado genes regulados por hierro. La mutación de los genes *fhuE* y de la O-metiltransferasa no causó disminución en la capacidad de crecimiento en déficit de hierro, lo que sugiere una redundancia de sus funciones. Cabe destacar que el gen de la O-metiltransferasa se halla regulado fuertemente por la disponibilidad de hierro extracelular a través de la proteína Fur.

La técnica de la hibridación sustractiva nos ha permitido identificar genes específicos de ambas subespecies. Algunos de estos genes están directamente relacionados con las diferencias fenotípicas existentes entre ambas subespecies, como es el caso de los genes de hemolisinas y genes de síntesis del flagelo. Es destacable el alto número de transposasas dispuestas de manera multicopia en el genoma de la subsp. *piscicida*, así como también el alto número de genes específicos de la subsp. *damsela*. Es tentativo pensar que el alto número de transposasas presentes en la subsp. *piscicida* sea el responsable de las diferencias fenotípicas en ambas subespecies, ya que las transposasas se hallan implicadas en procesos de reorganizaciones cromosómicas que frecuentemente dan lugar a la pérdida de genes y por consiguiente fenotipos.

La hemólisis producida por las cepas altamente hemolíticas de *P. damsela* subsp. *damsela* se debe a la presencia de pPHDD1, un plásmido movilizable de 150 kb. Dicha hemólisis se debe a la presencia de dos hemolisinas codificadas en su secuencia: Dly (una esfingomielinasa con actividad hemolítica caracterizada en los años 80) y HlyA (una hemolisina perteneciente a la familia de las toxinas formadoras de poro descrita por primera vez en este trabajo). Estas toxinas juegan un papel clave en la actividad hemolítica y virulencia de *P. damsela* subsp. *damsela* frente a ratón y rodaballo. Además de las toxinas codificadas en pPHDD1, *P. damsela* subsp. *damsela* presenta otra copia del gen *hlyA* en el cromosoma (*hlyA<sup>cr</sup>*). Esta hemolisina es responsable de la actividad hemolítica en las cepas que carecen del plásmido pPHDD1 y junto con Dly y HlyA<sup>pl</sup> es la responsable de la actividad hemolítica en las cepas que presentan pPHDD1.

La hemólisis derivada de la interacción de las tres hemolisinas se debe a fenómenos de sinergia hemolítica. Dicha sinergia, que sigue un patrón similar al descrito en el “umbrella model”, se debe a la acción de la Dly que provoca un debilitamiento de la membrana del eritrocito de tal manera que facilita la acción hemolítica posterior de las dos HlyAs. Esta acción sinérgica de la Dly, además de producirse con cepas de *P. damsela*, también ocurre con otras especies bacterianas como *Vibrio cholerae* o *Streptococcus agalactiae* mostrando efectos similares a los producidos en las reacciones de tipo CAMP.

El modelo de regulación que siguen las tres hemolisinas sigue un complejo patrón donde la delección de *hlyA<sup>cr</sup>* provoca una represión de la actividad hemolítica de HlyA<sup>pl</sup>, y dicha represión está mediada por la presencia de Dly. Además, hemos observado que factores ambientales como la concentración de NaCl o de hierro juegan un papel regulador imprescindible para una máxima expresión hemolítica.

A la vista de todo lo expuesto podemos concluir que la variabilidad fenotípica que presentan las subespecies *damsela* y *piscicida* entre sí se debe en gran medida a mecanismos de transposición que han provocado la pérdida de genes, principalmente en la subsp. *piscicida*, así como también a mecanismos de transferencia horizontal que han permitido la ganancia de nuevas funciones génicas, como es el caso de pPHDD1 cuya estructura presenta un mosaicismo modular.



Los agradecimientos, esa parte de la tesis que se escribe de último pero se lee de primero. Quiero agradecer la realización de este trabajo:

A mis directores de tesis: los profesores Manuel Luís Lemos Ramos y Carlos Rodríguez Osorio por darme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación, y porque juntos forman un gran equipo que me ha proporcionado un ambiente de trabajo inigualable.

En especial a mis padres por darme la vida. A mi madre, por su fortaleza a la hora de afrontar los problemas que plantea la vida. A mi padre, por su buen saber hacer y constancia en la vida, pero sobre todo por su nobleza. A mi familia, fundamental en la vida, principalmente a mi hermana Rebeca y mis tíos Julio y Carmen que siempre me han apoyado en el día a día, no sólo de este trabajo sino de toda mi vida.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio con los que he pasado todos estos años por crear un ambiente de trabajo tan agradable: Lucía, Macamen, David, Pilar, Bea, Ana, Arturo y muy especialmente a Miguel por su inestimable ayuda y de quien a nivel personal y laboral solo tengo palabras de elogio. A todo el departamento: el grupo del CIBUS, el grupo de Virología (qué iba a hacer yo sin su cámara de fotos!!), a Placeres (tantas sonrisas me ha sacado) y en especial a Soledad Núñez, por su cariño y por su desinteresada e imprescindible ayuda.

No podría olvidarme de agradecer a mis amigos más allegados su apoyo y comprensión, especialmente a Yago, Daniel y a Pablo con los que he vivido experiencias inolvidables.

Por último y no por ello menos importante, a Xela, mi compañera, que siempre me ha aguantado en todos los momentos duros de este trabajo y me ha aportado la calma que en tantas ocasiones me ha faltado.

A todos, mi más sincera gratitud.



Abreviaturas:

**Amp:** Ampicilina

**CAMP:** Efecto de sinergia hemolítica descrita por Christie, Atkins y Munch-Petersen

**CAS:** Cromo Azurol S

**cfu:** Unidades formadoras de colonia

**Cm:** Cloranfenicol

**CM9:** Medio Mínimo de Miller suplementado con casaminoácidos al 0,2%

**Dipiridil:** 2,2'-Dipiridil. Quelante de hierro

**DMSO:** Dimetil sulfóxido

**dNTP:** Desoxinucleótido 5' trifosfato

**DO:** Densidad óptica

**EDDA:** Ácido etilen-diamino-di-(o-hidroxifenilacético)

**EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético

**Gm:** Gentamicina

**HDTMA:** Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

**HG:** Halo grande

**HM:** Halo mediano

**HP:** Halo pequeño

**IPTG:** Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

**Kan:** Kanamicina

**KDal:** Kilodaltons

**LB:** Medio Luria Bertani

**ONPG:** Orto-nitrofenilgalactopiranosido

**PEG:** Polietilenglicol

**Rif:** Rifampicina

**TAE:** Tampón Tris-EDTA

**Tet:** Tetraciclina

**Tm:** Temperatura de fusión

**TSA-1:** Agar de soja y Triptona +1% NaCl

**TSC-1:** Caldo de soja y Triptona +1% NaCl

**UH:** Unidades hemolíticas

**X-gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido



**I. INTRODUCCIÓN**

1. La acuicultura en España	7
2. <i>Photobacterium damsela</i> y su repercusión en la acuicultura	9
2.1 <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	9
2.2 <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	10
3. <i>Photobacterium damsela</i> : Posición taxonómica	13
4. Características morfológicas, bioquímicas y serológicas	14
4.1 <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	15
4.2 <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	16
5. Mecanismos de virulencia	18
5.1 Mecanismos de captación de hierro	19
5.1.1 Sistemas de captación de hierro en <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	21
5.1.2 Sistemas de captación de hierro en <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	22
5.2 Presencia de material exopolisacárido (cápsula)	24
5.3 Factores de adherencia e invasión celular	25
5.4 Plásmidos	27
5.5 Exotoxinas	29
5.5.1 Exotoxinas producidas por <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	30
5.5.2 Exotoxinas producidas por <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	31
5.6 <i>P. damsela</i> : perspectivas futuras	33

**II. OBJETIVOS** 37**III. MATERIALES Y MÉTODOS**

1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	41
2. Extracción de ADN	45
3. PCR y PCR Inversa (I-PCR)	45
4. Clonación de fragmentos de ADN	47
5. Transformación de plásmidos en <i>E. coli</i>	48
5.1. Transformación por choque térmico	48
5.2. Transformación por electroporación	49
6. Secuenciación de DNA y herramientas de bioinformática	50
7. Ensayo de titulación de Fur (FURTA)	51
8. Obtención de mutantes espontáneos resistentes a rifampicina	52
9. Mutagénesis	52
9.1. Obtención de mutantes por intercambio alélico	52
9.2. Obtención de mutantes por inserción	57
10. Complementación de los mutantes con el gen salvaje	57
11. Ensayos de crecimiento en limitación de hierro	58
12. Hibridación sustractiva (SSH)	59
13. Hibridación ADN-ADN mediante Dot Blot	61
14. Obtención de una genoteca de cósmidos de la cepa RM-71	61
15. Ensayo de actividad hemolítica	62
15.1 Medición de la actividad hemolítica en placas de agar sangre	62
15.2 Medición de la actividad hemolítica a partir de productos extracelulares	63
16. Fusiones transcripcionales y ensayos de actividad $\beta$ -galactosidasa	64
17. Ensayos de virulencia	67
17.1 Ensayos de virulencia en rodaballo	67
17.2 Ensayos de virulencia en ratón	67

#### IV. RESULTADOS

1. Búsqueda e identificación de genes implicados en la captación de hierro mediada por sideróforos en <i>P. damsela</i>	71
1.1 Pruebas de crecimiento en condiciones de limitación de hierro	72
1.2 Ensayo de titulación de Fur (FURTA)	73
1.2.1 Genes regulados por hierro en la subsp. <i>piscicida</i>	74
1.2.2 Genes regulados por hierro en la subsp. <i>damsela</i>	78
1.3 Generación y estudio de los mutantes para <i>fhuE</i> y el gen de la O-metiltransferasa	80
1.3.1 Obtención de mutantes por intercambio alélico de los genes de la O-metiltransferasa y <i>fhuE</i>	80
1.3.2 Determinación del fenotipo de producción de sideróforos de los mutantes para los genes de la O-metiltransferasa y <i>fhuE</i>	81
1.3.3 Estudio de la regulación transcripcional del gen de la O-metiltransferasa	82
2. Aplicación de la hibridación sustractiva al estudio de la diversidad genética en <i>P. damsela</i>	85
2.1 Selección de fragmentos génicos específicos de las cepas P3335 y RM-71 mediante hibridación sustractiva	85
2.1.1 Identificación de fragmentos génicos específicos de la cepa P3335 de la subsp. <i>piscicida</i>	86
2.1.2 Identificación de fragmentos génicos específicos de la cepa RM-71 de la subsp. <i>damsela</i>	91
3. Identificación y caracterización de los genes determinantes de la actividad hemolítica en <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> .	101
3.1 Búsqueda del contexto genético de las diferentes hemolisinas	101
3.2 Estructura genética de pPHDD1	104
3.2.1 Genes relacionados con funciones replicativas y de partición	106
3.2.2 Sistemas de secreción (genes <i>tra</i> y genes <i>tad</i> )	107
3.2.3 Genes relacionados con actividades hemolíticas	108
3.2.4 Genes relacionados con virulencia	110
3.2.5 Genes relacionados con procesos reguladores o metabólicos	110
3.2.6 Genes exclusivos de la cepa RM-71	111
3.3 Distribución de pPHDD1 en las cepas de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> : correlación con el fenotipo hemolítico	119
3.4 pPHDD1 puede conjugarse a <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y conferirle actividad hemolítica	122
3.5 La curación de pPHDD1 causa una fuerte disminución de la actividad hemolítica	124
3.6 HlyA y Dly contribuyen a la actividad hemolítica de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	125
3.7 Dly y HlyA contribuyen a la virulencia de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> para ratón y rodaballo	128
4. La actividad hemolítica de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> no reside únicamente en las hemolisinas codificadas en pPHDD1	131
4.1 <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> produce hemolisinas adicionales codificadas en el cromosoma	131
4.2 Ensayos de hemólisis en líquido: HlyA <sup>pl</sup> y HlyA <sup>cr</sup> presentan diferentes actividades hemolíticas	135
4.3 Estudio de los dominios conservados en las hemolisinas HlyA <sup>pl</sup> y HlyA <sup>cr</sup>	138
4.4 Sinergia hemolítica. Existencia de reacciones CAMP en <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	144
4.5 Dly ejerce un efecto inhibitorio en la actividad de HlyA <sup>pl</sup>	148
4.6 Clonación de los genes <i>dly</i> , <i>hlyA<sup>pl</sup></i> y <i>hlyA<sup>cr</sup></i> en <i>E. coli</i>	152
4.7 Regulación transcripcional de los genes <i>dly</i> , <i>hlyA<sup>pl</sup></i> y <i>hlyA<sup>cr</sup></i>	154
4.7.1 Los genes <i>dly</i> , <i>hlyA<sup>pl</sup></i> y <i>hlyA<sup>cr</sup></i> se hallan regulados a nivel transcripcional por factores ambientales como la concentración salina o la falta de hierro	155
4.8 La cepa tipo de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> ATCC 33539 muestra un fenotipo hemolítico intermedio	158
4.9 Papel de HlyA <sup>cr</sup> en la virulencia para ratón y rodaballo	161
V. DISCUSIÓN	167
VI. CONCLUSIONES	191
VII. BIBLIOGRAFÍA	195
VIII. ANEXO: artículo derivado de la tesis	219

## I. Introducción





## 1. La acuicultura en España

La acuicultura en su conjunto produce hoy en día más de la mitad del pescado consumido en el mundo. Es un sector que se ha desarrollado considerablemente, sobre todo durante los últimos 30 años, experimentando un incremento mundial del 8,8% anualmente. Según el informe de la Organización para la Agricultura y la Alimentación de Naciones Unidas (FAO), en el año 2008 la acuicultura mundial produjo 68,4 millones de toneladas, frente a los aproximadamente 67 millones de toneladas capturadas para consumo humano por la pesca. La producción global de la acuicultura ha crecido de manera espectacular desde menos de 0,6 millones de toneladas en 1950 (y un valor de menos de 400.000 euros) a los mencionados 68,4 millones de toneladas en 2008 (con un valor global aproximado de 84.791 millones de euros).

La acuicultura es también una fuente importante de productos acuáticos de calidad en Europa, constituyendo un importante mercado. Según las estadísticas de FAO, en 2008 se produjeron 1.277.800 toneladas de productos de la acuicultura y esta producción tuvo un valor en primera venta de 3.800 millones de euros. España es el Estado Miembro de la UE con una mayor producción en acuicultura en toneladas (Garza-Gil *et al.*, 2009). Desde 1997, figura en primer lugar en cuanto a volumen de producción se refiere y, por ejemplo, en 2008 se obtuvieron 249.070 toneladas (19,5% del total de la UE) seguido por Francia con 237.870 toneladas (18,6%). Esta posición es debida a diversos factores, entre los cuales podemos destacar la gran diversidad climática y orográfica existente en los 8.000 kilómetros de línea de costa, lo cual permite afrontar una gran variedad de cultivos acuícolas. Otro factor que favorece el desarrollo de la acuicultura en España es la tradición de incluir productos marinos en el consumo alimenticio, dando lugar a una gran demanda de los mismos en la dieta (37,5 kg por persona al año). En España existe un amplio rango de especies de peces cultivables, pero la lubina (*Dicentrarchus labrax*), la dorada (*Sparus aurata*) y el rodaballo (*Psetta maxima*) son las especies con mayor producción y comercialización. En la zona de la franja atlántica, la acuicultura muestra un claro predominio por la crianza de rodaballo (*Psetta maxima*). Además, en las mismas plantas de acuicultura normalmente también se realiza cultivo de lenguado (*Solea senegalensis*), no sólo en

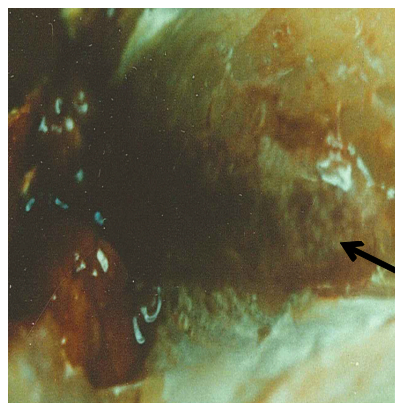
Galicia sino también en Canarias y Andalucía. Sin embargo la producción de besugo (*Pagellus bogaraveo*) es exclusiva de Galicia y supuso la puesta en el mercado de 185 toneladas en 2009. En el área del mediterráneo, lubina y dorada son las especies de mayor predominio aunque también la corvina (*Argyrosomus regius*) empieza a ser habitual en varios países. La producción de anguila (*Anguilla anguilla*) se encuentra distribuida entre País Vasco y regiones del área del mediterráneo como Andalucía, Cataluña y Comunidad Valenciana, donde el cultivo de esta especie es una actividad tradicional. La franja del mediterráneo está experimentando un importante crecimiento debido a su potencial y a la sobreexplotación de la industria pesquera (Rodgers & Furones, 1998). Desde 1984, la acuicultura en esta zona está dominada principalmente por tres países: Francia, Italia y España, aunque actualmente Grecia y Turquía están aumentando de forma notable sus niveles de producción. Este incremento de producción ha dado lugar a una saturación en los mercados. Dicha situación conlleva la búsqueda de nuevos productos de interés económico, ya que la diversidad de especies podría compensar tal saturación. Con este fin, numerosas especies nuevas han sido introducidas con diverso éxito, entre las cuales se encuentran: sargo común (*Diplodus sargus sargus*), sargo picudo (*Diplodus puntazzo*), dentón común (*Dentex dentex*), mero (*Epinephelus marginatus*), pargo (*Pagrus pagrus*), pargo sémola (*Pagrus auriga*), lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) o también el atún azul o común (*Thunnus thynnus*) (Rigos & Katharios, 2010), pero la introducción de nuevas especies de cultivo conlleva diversos obstáculos como condiciones deficientes para la cría de los animales, factores medioambientales adversos o patologías debido a bacterias, parásitos y virus. En la franja del mediterráneo, los principales problemas de tipo bacteriológico son la pasteurelosis y la vibriosis. La pasteurelosis es causada por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y afecta a diversas especies de peces como dorada, lenguado o lubina. La vibriosis es causada por diferentes especies de los géneros *Vibrio* y *Photobacterium*, siendo las infecciones causadas por *P. damsela* subsp. *damsela* un problema emergente, que afecta principalmente a especies como anguila, dorada o lubina (Rodgers & Furones, 1998).

## 2. *Photobacterium damsela* y su repercusión en la acuicultura

*P. damsela* es una eubacteria Gram negativa perteneciente al subgrupo gamma-3 del phylum *Proteobacteria* (Gauthier *et al.*, 1995) y comprende dos distintas subespecies: la subespecie *damsela* y la subespecie *piscicida*. Ambas subespecies incluyen las especies antiguamente denominadas *Vibrio damsela* y *Pasteurella piscicida* respectivamente, y que por lo tanto se clasificaban dentro de dos familias diferentes (*Vibrionaceae* y *Pasteurellaceae*), aspecto que concordaba con el amplio rango de diferencias fenotípicas existentes entre ambas. Sin embargo, un estudio realizado a partir de la secuenciación del gen del ARN ribosómico 16S y ensayos de hibridación DNA-DNA demostraron que *Vibrio damsela* y *Pasteurella piscicida* eran miembros de una única especie (Gauthier *et al.*, 1995).

### 2.1 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

La pasteurelosis o fotobacteriosis es causada por *P. damsela* subsp. *piscicida*, y es una de las enfermedades de etiología bacteriana con mayor repercusión económica en los cultivos de peces marinos a nivel mundial. Probablemente es la patología más devastadora en la producción de pargo (*Pagrus pagrus*) en el área del mediterráneo (Rodgers & Furones, 1998). Esta enfermedad también es conocida como pseudotuberculosis, debido a que los peces enfermos en casos crónicos presentan gránulos blancos prominentes en órganos internos como bazo, riñón o hígado, consistentes en una acumulación de células bacterianas (Figura I.1). Otros signos externos de esta enfermedad son un ligero oscurecimiento de la piel y distensión abdominal acompañada a veces de áreas



**Figura I.1:** Formación de nódulos en riñón de dorada (flecha negra) afectada por *P. damsela* subsp. *piscicida*.

hemorrágicas en cabeza y branquias (Toranzo *et al.*, 1991). La pasteurelosis parece ser una enfermedad de mayor prevalencia en los meses de verano donde la temperatura del agua es más alta (mayor de 23 °C) (Hawke *et al.*, 1987). *P. damsela* subsp. *piscicida* sobrevive en estado viable en el agua durante 4 o 5 días, y es capaz de entrar en un estado viable no cultivable de al menos un mes (Magariños *et al.*, 1994a),

actuando los sedimentos marinos y el agua de mar como reservorios y vehículo de transmisión para este patógeno. Los hospedadores de *P. damsela* subsp. *piscicida* incluyen diferentes especies de peces marinos, tanto salvajes como de cultivo. La enfermedad fue primeramente descrita en 1963 en poblaciones salvajes de perca blanca (*Morone americanus*) y en menor grado en las de lubina americana (*Morone saxatilis*) en una epizootia en Chesapeake Bay (Maryland, USA). Desde 1969 la pasteurelosis ha sido una de las más importantes enfermedades en Japón, afectando principalmente a seriola (*Seriola quinqueradiata*), aunque también afecta a otras especies como el mero de pintas rojas (*Epinephelus akaara*) (Ueki *et al.*, 1990) y a una especie de blenio (*Pictiblennius yatabei*) (Hamaguchi *et al.*, 1991). Desde 1990 ha causado grandes pérdidas económicas en cultivos de dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*) y lenguado (*Solea senegalensis* y *Solea solea*) en países europeos del área mediterránea y también en perca (*Morone americanus*) en Estados Unidos (Toranzo *et al.*, 2005). Recientemente se ha aislado de cobia (*Rachycentron canadum*) y pez del paraíso (*Macropodus opercularis*) (Liu *et al.*, 2011b; Liu *et al.*, 2011a) en Taiwán y también de salmonete (*Mullus spp.*) en Italia (Serracca *et al.*, 2011).

## **2.2 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela***

En 1981, *P. damsela* subsp. *damsela* fue aislado a partir de úlceras en la piel del pez ángel (*Chromis punctipinnis*) (Love *et al.*, 1981). Se puede aislar *P. damsela* subsp. *damsela* de diferentes ecosistemas acuáticos, ya que este organismo es capaz de sobrevivir en agua de mar y sedimentos durante largos períodos de tiempo. Además es capaz de ser posteriormente transmitido a través del agua (Fouz *et al.*, 2000), siendo responsable de causar procesos patológicos en diversas especies marinas. Normalmente los brotes infecciosos producidos por *P. damsela* subsp. *damsela* siguen una distribución estacional, coincidiendo con temperaturas del agua más templadas y una disminución en la resistencia del organismo hospedador debida a cambios fisiológicos durante su madurez sexual (Austin, 2010). Además, el incremento de la temperatura media del agua del mar, que está ocurriendo de manera generalizada durante estas últimas décadas como consecuencia del calentamiento global, posiblemente provocará un aumento en el número de infecciones producidas

por este organismo. Los signos externos más destacables que causa *P. damsela* subsp. *damsela* en peces son: distensión abdominal, presencia de áreas hemorrágicas alrededor de ojos, boca y ano y en ocasiones úlceras cutáneas (Figura I.2). Estos signos son similares a los producidos por *Yersinia ruckeri* en salmónidos. Internamente se observa una acumulación de fluido hemorrágico dentro de la cavidad peritoneal (Fouz *et al.*, 1992). Los hospedadores de *P. damsela* subsp. *damsela* incluyen diferentes especies de animales marinos, tanto salvajes como de cultivo. *P. damsela* subsp. *damsela* es patógena para reptiles como la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) (Obendorf *et al.*, 1987), moluscos como el pulpo (*Octopus joubini*) (Hanlon *et al.*, 1984), crustáceos como el camarón (*Penaeus monodon*) (Song *et al.*, 1993; Vaseeharan *et al.*, 2007), mamíferos como el delfín (*Tursiops truncatus*, *Delphinus delphis*) (Fujioka *et al.*, 1988) o la ballena (*Balaenoptera edeni*) (Buck *et al.*, 1991), peces salvajes como el tiburón (*Carcharhinus plumbeus*, *Squalus acanthias*) (Grimes *et al.*, 1984a; Grimes *et al.*, 1984b), pez ángel (*Chromis punctipinnis*) (Love *et al.*, 1981), medregal del Japón (*Seriola quinqueradiata*) (Sakata *et al.*, 1989) o raya (*Dasyatis pastinaca*) (Pedersen *et al.*, 1997). Pero es también patógeno de peces de interés económico como el rodaballo (*Psetta maxima*) (Fouz *et al.*, 1992), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Pedersen *et al.*, 2009), la palometa blanca (*Trachinotus ovatus*) (Zhao *et al.*, 2009), una especie de lenguado (*Cynoglossus semilaevis*) (Zhang *et al.*, 2011) o la perca gigante (*Lates calcarifer*) (Kanchanopas-Barnette *et al.*, 2009) muy utilizados para acuicultura en China y Tailandia respectivamente. En el área del mediterráneo han surgido nuevas especies destinadas a la producción en acuicultura, sin embargo, el cultivo intensivo de estas especies ha provocado varios brotes con mortalidad moderada en los que se ha visto involucrada *P. damsela* subsp. *damsela*. Entre las especies afectadas se encuentran: dentón común (*Dentex dentex*) (Company *et al.*, 1999), pargo sémola (*Pagrus auriga*) (Labella *et al.*, 2006), sargo común (*Diplodus sargus*) (García-Rosado *et al.*, 2007), dorada (*Sparus aurata*) (Labella *et al.*, 2010; Pujalte *et al.*, 2003) y en menor medida lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Labella *et al.*, 2010).

*P. damsela* subsp. *damsela* no solo afecta a especies poiquilotermas, sino que debido a su capacidad de crecimiento a 37 °C, es potencialmente patógena para animales homeotermos, entre los cuáles se encuentra el hombre. Este organismo fue

aislado por primera vez como agente causal de un caso infeccioso registrado en seres humanos en 1971 (Morris *et al.*, 1982). En el hombre, causa desde infecciones ulcerosas externas (Figura I.2) hasta septicemias generalizadas que pueden llevar a la muerte del individuo, por lo que su importancia en clínica humana ya ha sido reconocida (Tabla I.1). Normalmente la infección deriva de lesiones cutáneas superficiales producidas durante la manipulación de peces marinos infectados, o a través de heridas externas que entran en contacto con el agua de mar. Aunque se han detectado casos en pacientes completamente sanos, gran parte de los cuadros clínicos causados por *P. damsela* subsp. *damsela* tienen lugar en pacientes que presentan algún tipo de enfermedad como diabetes, cirrosis o afecciones cardíacas.



**A**



**B**

**Figura I.2:** Lesiones externas causadas por infección de *P. damsela* subsp. *damsela* en: (A) rodaballo y (B) humano.

**Tabla I.1:** Casos clínicos procedentes de infecciones producidas por *P. damsela* subsp. *damsela*.

Fecha y referencia	Procedencia	Paciente	Modo de infección	Enfermedad subyacente	Resultado
(Morris <i>et al.</i> , 1982)	N/D	6 casos	Herida expuesta a agua salobre	No (persona sana)	N/D
(Clarridge & Zigelboimdaum, 1985)	USA	Hombre de 61 años	Manejo de pez gato	Pancreatitis y diabetes	Muerte
(Coffey <i>et al.</i> , 1986)	USA	N/D	N/D	N/D	Infección necrotizante
(Dryden <i>et al.</i> , 1989)	Australia	N/D	Herida infecciosa	N/D	N/D
(Pérez-tirse <i>et al.</i> , 1993)	USA	Hombre de 70 años	Manejo de pescado	No (persona sana)	Septicemia fulminante
(Yuen <i>et al.</i> , 1993)	Sudeste asiático	N/D	Daño producido por <i>Siganus vulpinus</i>	No (persona sana)	Muerte por fascitis necrotizante
(Shin <i>et al.</i> , 1996)	N/D	Hombre de 63 años	N/D	Diabetes y cirrosis	N/D
(Fraser <i>et al.</i> , 1997)	USA	Hombre de 64 años	Manejo de pescado	Enfermedad cardíaca	Muerte
(Tang & Wong, 1999)	N/D	N/D	N/D	N/D	Fascitis necrotizante
(Barber & Swygert, 2000)	N/D	N/D	Herida por raya	N/D	Fascitis necrotizante
(Goodell <i>et al.</i> , 2004)	USA	Hombre de 69 años	N/D	N/D	Muerte por fascitis necrotizante
(Asato & Kanaya, 2004)	Japón	Hombre de 58 años	Pescando	Diabetes mellitus	Muerte por fascitis necrotizante
(Yamane <i>et al.</i> , 2004)	Japón	Hombre de 76 años	Pescando	No	Muerte por fascitis necrotizante
(Knight-Madden <i>et al.</i> , 2005)	Jamaica	Niño	N/D	Anemia falciforme	Bacteremia
(Álvarez <i>et al.</i> , 2006)	USA	Mujer embarazada de 22 años	N/D	No	Infección urinaria
(Nakamura <i>et al.</i> , 2008)	Japón	Hombre de 68 años	Herida de arpón	Diabetes mellitus	Fascitis necrotizante
(Aigbivhalu & Maraqa, 2009)	USA	Chico de 14 años	Herida infecciosa	N/D	N/D
(Kim <i>et al.</i> , 2009)	Corea	Hombre de 46 años	Ingestión oral	Cirrosis	Septicemia y muerte posterior por fallo hepático

N/D: no disponible

### 3. *Photobacterium damsela*: Posición taxonómica

Si bien la pasteurelosis es una enfermedad bien conocida desde hace muchos años, la posición taxonómica de su agente causal ha sido objeto de constante controversia. En 1964 Snieszko *et al.* situaron este microorganismo dentro del género *Pasteurella* según sus propiedades morfológicas y bioquímicas, a pesar de la incapacidad del organismo para reducir nitratos, ser la única bacteria marina perteneciente a este género y presentar una tolerancia a unos valores de pH y temperatura inusuales para miembros del género *Pasteurella*. Más tarde en 1968, Janssen y Surgalla al realizar nuevos ensayos, hallaron suficientes diferencias en características fisiológicas y serológicas con relación a especies del mismo género

como para proponer una nueva especie denominada *Pasteurella piscicida*. Estudios filogenéticos posteriores confirman la ubicación de *Pasteurella piscicida* dentro de la familia *Vibrionaceae* y la asociación de este organismo con *Photobacterium damsela* (Gauthier *et al.*, 1995). Así, se determinó que las secuencias del gen del ARNr 16S de *Pasteurella piscicida* y *Photobacterium damsela* difieren sólo en un nucleótido de 1.434 posiciones secuenciadas. Al realizar análisis de hibridación DNA-DNA, se llegó a la conclusión de que *Pasteurella piscicida* y *Photobacterium damsela* eran miembros de la misma especie (Gauthier *et al.*, 1995).

*Photobacterium damsela* subsp. *damsela* fue inicialmente incluida dentro del género *Vibrio* como *Vibrio damsela* (Love *et al.*, 1981), y posteriormente fue reasignada como *Listonella damsela* en base a la secuenciación del ARNr 5S (MacDonell & Colwell, 1984). Sin embargo, esta herramienta ofrece un limitado valor a la hora de asignar el género, y sobre todo en grupos evolutivamente recientes como es el caso de *Vibrionaceae* (Schleifer & Stackebrandt, 1983). Por ello, el estudio de características fenotípicas como la ausencia de vaina flagelar o la acumulación de PHB (poli-hidroxibutirato) durante la fase de crecimiento llevó a renombrarla como *Photobacterium damsela* (Smith *et al.*, 1991). Posteriormente debido a la reasignación de *Pasteurella piscicida* dentro de la especie *P. damsela*, *P. damsela* fue finalmente nombrada como *P. damsela* subespecie *damsela*.

#### 4. Características morfológicas, bioquímicas y serológicas

Morfológicamente, los miembros del género *Photobacterium* son bacilos rectos de 0,8-1,3 x 1,8-2,4  $\mu\text{m}$ , aunque *P. damsela* and *P. leiognathi* muestran una forma cocobacilar, donde *P. damsela* subsp. *piscicida* muestra una tinción bipolar atípica. Excepto *P. damsela* subsp. *piscicida*, todas las especies pertenecientes al género *Photobacterium* son móviles, variando el número de flagelos polares entre 1 y 3, que a diferencia de los presentes en el género *Vibrio*, carecen de vaina. Las especies se caracterizan por ser anaerobias facultativas, quimioorganotróficas con un metabolismo fermentativo y respiratorio. Su crecimiento óptimo necesita un rango de 160-280 mM de iones  $\text{Na}^+$  así como un rango de temperaturas que oscila entre 18 y 25 °C, salvo *P. profundum*, que es un organismo psicrófilo incapaz de crecer por encima de 20 °C.



#### **4.1 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida***

*P. damsela* subsp. *piscicida* es un bacilo (0,8-1,3 x 1,4-4  $\mu\text{m}$ ) Gram negativo inmóvil (Figura I.5), oxidasa y catalasa positivo, fermentativo y anaerobio facultativo, sensible al agente vibriostático O/129, positivo para los test rojo metilo y Voges-Proskauer, pero negativo para las reacciones de indol, ureasa, gelatinasa, amilasa y citrato, no produce gas a partir de glucosa y es incapaz de reducir nitratos (Magariños *et al.*, 1992a) (Figura I.3). Presenta una característica tinción bipolar y puede mostrar pleomorfismo, variando su forma dependiendo de las condiciones de cultivo o de la fase de crecimiento, ya que crecen formando cadenas, son más largos y muestran una forma más bacilar que en fases más tardías donde su forma se asemeja más a cocobacilos (Hawke, 1996). Presenta actividades lipasa y fosfolipasa pero carece de actividad  $\beta$ -hemolítica, aunque ha sido descrita recientemente una fosfolipasa con actividad hemolítica frente a eritrocitos de diferentes peces (Naka *et al.*, 2007). Tiene un carácter halófilo obligado, mostrando un buen crecimiento en medios con una concentración de 1,5-2% de NaCl. Este crecimiento se inhibe completamente a concentraciones de NaCl por encima del 5%. No presenta bioluminiscencia y es capaz de producir material capsular con un 96% de carbohidrato y un 0,4% de proteína (Romalde, 2002). Presenta un estrecho rango de temperaturas entre los 15 y 30 °C a las cuales es capaz de crecer, aunque su óptimo de crecimiento se sitúa en torno a los 25 °C. Estudios serológicos con células totales y el antígeno O somático, demostraron que no se pueden establecer diferentes serogrupos dentro de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Este hecho fue corroborado al estudiar los patrones de lipopolisacáridos y proteínas de membrana externa. Ensayos inmunoblot mostraron un alto nivel de similitud antigénica entre cepas, ya que todos los lipopolisacáridos mostraron una fuerte y similar reacción. Por otra parte, el análisis del contenido plasmídico de varias cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* procedentes de Japón, USA y Europa mostró un patrón similar entre las cepas de Estados Unidos y Europa, pero éste difería bastante de aquel mostrado por las cepas de procedencia Japonesa (Magariños *et al.*, 1992a).



**Figura 1.3:** Resultado de la identificación bioquímica de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* utilizando el sistema de identificación rápida api20E.

## 4.2 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*

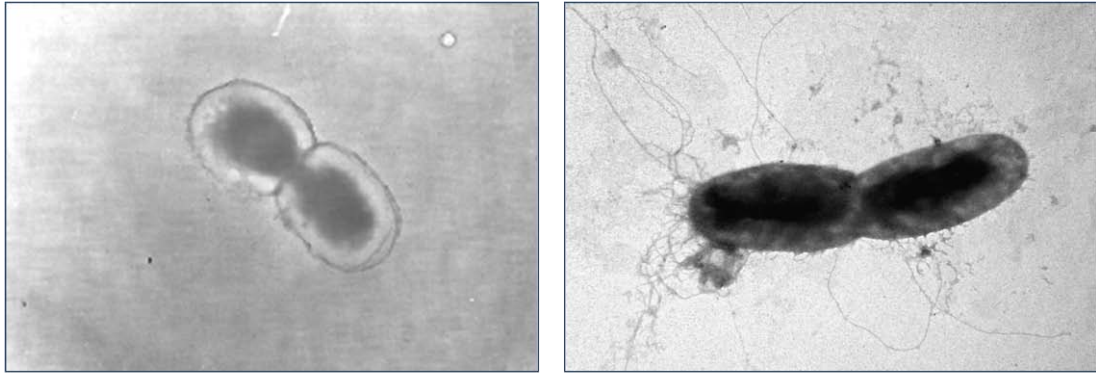
*P. damsela* subsp. *damsela* es un bacilo Gram negativo, móvil mediante flagelos polares monotricos con cierto pleomorfismo (Figura 1.5). Es catalasa y arginina dehidrolasa positivo, sensible al agente vibriostático 0/129, fermentador de glucosa con producción de gas, fermentador de manosa y maltosa, positivo para los test rojo metilo y Voges-Proskauer (Figura 1.4), es positiva para la producción de ureasa, lipasa, amilasa, quitinasa, también es positiva para las pruebas de fosfolipasa, condroitinasa, hialuronidasa y hemólisis, pero no todas las cepas presentan los mismos valores, e incluso algunas carecen de tales actividades. Muestra requerimientos estrictos de NaCl, tolerando concentraciones que alcanzan el 5% (Fouz *et al.*, 1992). A diferencia de la subsp. *piscicida*, presenta unos rangos de temperatura de crecimiento amplios, desde 12 °C a 37 °C (Tabla 1.2). El análisis del contenido en lipopolisacáridos mostró la existencia de una enorme variabilidad de perfiles de lipopolisacáridos. Este resultado se correlaciona con el obtenido en los ensayos serológicos, donde se encontró la existencia de cuatro serogrupos diferentes. El análisis de las proteínas de membrana externa mostró que a pesar de la existencia de bandas comunes, las cepas presentan diferentes patrones, oscilando la masa molecular de las bandas entre 20 y 90 kDa (Fouz *et al.*, 1997).



**Figura I.4:** Resultado de la identificación bioquímica de *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* utilizando el sistema de identificación rápida api20E.

**Tabla I.2:** Principales caracteres fenotípicos diferenciales entre *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. (V), color verde en medio TCBS.

Carácter		<i>Photobacterium damsela</i>	
		subsp. <i>piscicida</i>	subsp. <i>damsela</i>
Movilidad		-	+
Tinción bipolar		+	-
Nitrato reductasa		-	+
Crecimiento en TCBS		-	+(V)
Gas de glucosa		-	+
Lipasa		-	+
Amilasa		-	+
Crecimiento en 5% de NaCl		-	+
Producción de ácido de Maltosa		-	+
Crecimiento a 37 °C		-	+
Hemólisis de eritrocitos de	Cordero	-	+
	Trucha	+	+
Hospedadores		Peces	Peces
			Moluscos
			Crustáceos
			Mamíferos
			Reptiles
			Hombre
Diversidad Serológica		No	Sí



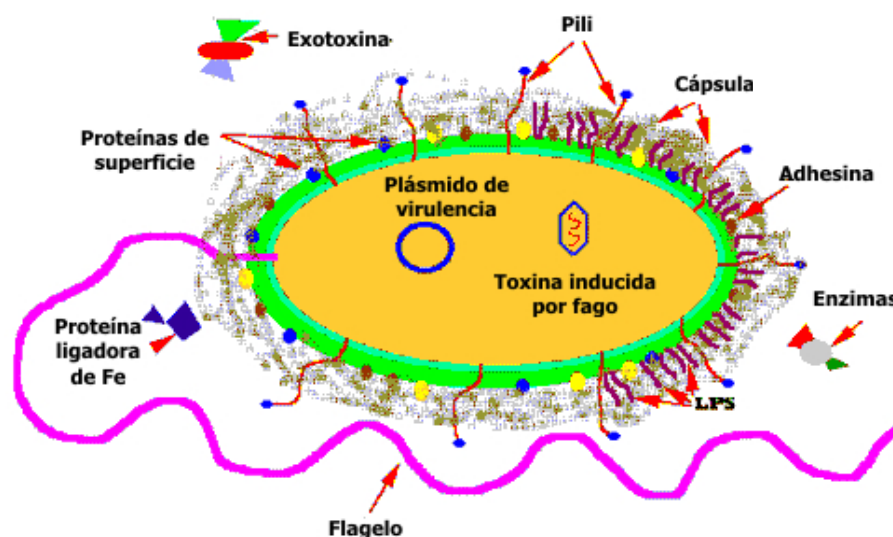
**Figura 1.5:** Fotografía mediante microscopía electrónica de transmisión: (A) *P. damsela* subespecie *piscicida* (B) *P. damsela* subespecie *damsela*.

## 5. Mecanismos de virulencia

La patogénesis es un proceso multifactorial que depende de diversos factores, de entre los cuales destacan como más importantes: el estado inmune del hospedador, la naturaleza del organismo patógeno (su capacidad para causar enfermedad, es decir, sus factores de virulencia) y el número de organismos en la exposición inicial. La patogenicidad es definida como la habilidad que presenta una bacteria para causar infección, y si esta infección produce manifestaciones de daño o síntomas es conocida como enfermedad. Para que una bacteria pueda causar una infección, debe adherirse a las células del hospedador y resistir la eliminación, es decir, debe ser capaz de llevar a cabo la colonización. Posteriormente debe invadirlas, resistir la fagocitosis y evadir las defensas del organismo hospedador, como por ejemplo el sistema del complemento. Posteriormente debe multiplicarse para persistir y competir por el hierro y otros nutrientes, aunque realmente una infección es el resultado de un desequilibrio entre los factores de virulencia de una cepa bacteriana particular y los mecanismos de defensa de un determinado hospedador (sobrerespuesta) en contra de este último. No es una ventaja para la bacteria provocar una enfermedad en el hospedador y ni mucho menos para el hospedador estar enfermo. La virulencia se produce cuando la bacteria se encuentra en el hospedador equivocado, o en el hospedador correcto pero en un lugar erróneo (Levin & Eden, 1990). El éxito se alcanza

cuando la bacteria evoluciona para adaptarse mejor a su hospedador, y multiplicarse a sus expensas causándole las mínimas molestias posibles.

Un factor de virulencia es una característica bacteriana que está directamente relacionada con la capacidad de causar enfermedad al organismo hospedador. Los factores de virulencia se pueden clasificar en dos categorías principales: aquellos que promueven la colonización y la invasión del organismo hospedador (flagelo; sistemas de captación de hierro; componentes de la cápsula y superficie celular; factores de adherencia, colonización e invasión) y aquellos que causan un daño directo a las células del organismo hospedador (exotoxinas) (Salyers & Whitt, 1994) (Figura I.6). A continuación resumiremos los principales factores de virulencia descritos hasta la fecha en la especie *P. damsela*.



**Figura I.6:** Factores de virulencia presentes en la mayoría de las bacterias patógenas Gram - .

## 5.1 Mecanismos de captación de hierro

En todos los seres vivos, incluidos los microorganismos, el hierro resulta ser un nutriente esencial para el desarrollo. Aunque el hierro es uno de los elementos más abundantes de la tierra, biológicamente no se halla disponible en la mayoría de los medios. En presencia del oxígeno el ión ferroso divalente ( $\text{Fe}^{+2}$ ) es rápidamente oxidado a la forma férrica trivalente ( $\text{Fe}^{+3}$ ), formando complejos de hidróxido de hierro. Esta forma presenta una solubilidad de  $10^{-17}$  M a pH 7, la cual es demasiado

baja para un crecimiento bacteriano que requiere en torno a  $10^{-3}$  M (Bagg & Neilands, 1987). En el cuerpo, la mayoría del hierro se halla intracelularmente unido a ferritina, hemosiderina o grupos hemo, y extracelularmente se halla unido a proteínas de gran afinidad por el hierro como la transferrina; como resultado, aunque existe una gran abundancia de hierro en los fluidos corporales, la cantidad de hierro libre es demasiado baja para soportar un crecimiento bacteriano (Griffiths, 1991). Debido a esto, las bacterias han tenido que experimentar adaptaciones que les permitan extraer el hierro del hospedador o de los polímeros insolubles que se encuentran en el ambiente y competir con otros microorganismos en diversos hábitats.

Para poder captar el hierro, las bacterias han desarrollado diferentes métodos, entre los cuales destacan principalmente la captación de hierro mediante sideróforos y a partir del grupo hemo. Los sideróforos (del griego sideros phoros, “portadores del hierro”) son quelantes férricos extracelulares de alta afinidad (del orden de  $10^{30}$ ) y bajo peso molecular. El papel que juegan estos compuestos es arrancar el hierro del medio ambiente u hospedador para hacerlo disponible a la célula mediante la solubilización del mismo. El grupo hemo está formado por una molécula de protoporfirina IX con un átomo de hierro en su interior. Es uno de los cofactores enzimáticos más importantes, ya que interviene en el transporte de oxígeno y generación de energía como funciones más importantes. El grupo hemo raramente se encuentra libre, es decir, dissociado de las proteínas que lo portan en los tejidos y fluidos humanos, e igualmente ocurre en el medio ambiente. Para solucionar este aspecto, los receptores bacterianos que permiten captar el grupo hemo presentan dominios con capacidad de unión a estas proteínas. Los receptores bacterianos del grupo hemo dependientes de TonB se pueden dividir en aquéllos que son específicos de sustrato y aquéllos que no discriminan entre las proteínas que portan el grupo hemo (Stojiljkovic & Perkins-Balding, 2002).

La disponibilidad de hierro es un factor crítico para las bacterias patógenas invasivas a la hora de colonizar los tejidos del hospedador, de manera que la capacidad de obtención de hierro es uno de los principales factores de virulencia en muchas especies bacterianas. A continuación, haremos un breve resumen sobre el conocimiento actual de los sistemas de captación de hierro en *P. damsela*.

### 5.1.1 Sistemas de captación de hierro en *P. damsela* subsp. *piscicida*

Se ha demostrado que las cepas de la subespecie *piscicida* pueden adquirir eficientemente el hierro extrayéndolo de la transferrina, y que todas las cepas independientemente de su origen geográfico producen sideróforos en condiciones de déficit de hierro. Se ha demostrado mediante ensayos químicos que la naturaleza química de este sideróforo no es ni de tipo hidroxamato ni de tipo catecol (Magariños *et al.*, 1994b). Mediante el ensayo de hibridación sustractiva entre una cepa de *P. damsela* subsp. *piscicida* y una cepa de *P. damsela* subsp. *damsela* se encontró un gen específico de la subsp. *piscicida* que podría estar involucrado en la síntesis de un sideróforo (Osorio *et al.*, 2006). Posteriormente la secuenciación de las regiones de ADN adyacentes a este gen permitió la identificación de 11 genes que forman parte de un operón de 35 kb (genes *irp*, de “iron regulated protein”) (Figura I.7).

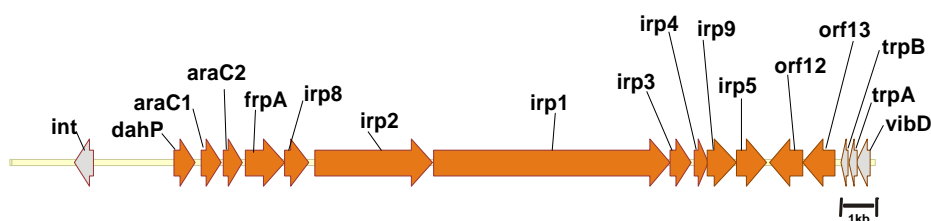


Figura I.7: Mapa físico del operón de genes *irp*, representados en color naranja.

Estos genes, que se expresan activamente en déficit de hierro, muestran una elevada similitud con los genes de síntesis y transporte de la yersiniabactina, sideróforo producido por varias especies de *Yersinia*. Debido a que los genes *irp* muestran una organización estructural similar a los genes de síntesis de la yersiniabactina, los cuales forman parte de una isla de patogenicidad (HPI), no se puede descartar que el operón *irp* forme también parte de una isla de patogenicidad (Osorio *et al.*, 2006). Además, ensayos de alimentación cruzada demostraron que el sideróforo producido por *P. damsela* subsp. *piscicida* puede promover el crecimiento en déficit de hierro de *Yersinia enterocolitica*, y viceversa. La isla de patogenicidad de *Yersinia* se halla presente en las cepas más virulentas y ausente en aquellas menos virulentas. La inactivación del operón *irp* por la delección de uno de sus genes produce una disminución del grado de virulencia de al menos dos órdenes de magnitud, por lo que su papel en la virulencia de este patógeno está claramente demostrado (Osorio *et*

*al.*, 2006). Estos resultados ponen de manifiesto que el sideróforo producido por *P. damsela* subsp. *piscicida* podría estar relacionado estructural y funcionalmente con la yersiniabactina. Las cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* muestran una clara diversidad a nivel genético en los sistemas de captación de hierro mediado por sideróforos. Las cepas de procedencia europeas presentan el operón *irp* mencionado anteriormente. En cambio, las cepas de origen japonés y americano carecen del mismo, y presentan un sistema de captación de hierro mediado por sideróforos diferente, cuya base genética permanece desconocida hasta la fecha.

Además de la producción de sideróforos, todas las cepas de la subsp. *piscicida* presentan la capacidad de captar el hierro a partir de compuestos como la hemina o la hemoglobina. Estas cepas presentan receptores de membrana externa regulados por hierro involucrados en la captación del grupo hemo a partir de dichos compuestos (Magariños *et al.*, 1994b). Los genes involucrados en la captación de grupos hemo en *P. damsela* ya han sido descritos (Río *et al.*, 2005) y su expresión durante el proceso infectivo ha sido demostrada en la subsp. *piscicida* (Osorio *et al.*, 2010). Ensayos de inducción de proteínas de membrana externa en condiciones de limitación de hierro mostraron la presencia de tres proteínas de aproximadamente 105, 118 y 145 kDa en la subespecie *piscicida*. Estas proteínas, probablemente actúen como receptores para captar sideróforos, transferrina o compuestos que contengan grupos hemo (Magariños *et al.*, 1994b). También se ha comprobado que la adición de una fuente de hierro (citrato, grupo hemo o hemoglobina) aumenta la susceptibilidad del pez a ser infectado reduciendo la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>), incluso por aquellas cepas que son consideradas como no virulentas. Este aspecto demuestra la importancia del hierro para un patógeno a la hora de establecer una infección en un organismo hospedador (Magariños *et al.*, 1994b).

#### **5.1.2 Sistemas de captación de hierro en *P. damsela* subsp. *damsela***

Se ha demostrado que las cepas de la subespecie *damsela* pueden crecer en condiciones de limitación de hierro. Todas las cepas pueden obtener eficientemente el hierro extrayéndolo de la transferrina o bien de quelantes de hierro sintéticos como el EDDHA (Fouz *et al.*, 1997). Dichas cepas producen un sideróforo del grupo de los hidroxamatos (Fouz *et al.*, 1997) pero al igual que las cepas japonesas de la subsp.



*piscicida* su base genética permanece desconocida hasta la fecha. Se ha podido comprobar que este sideróforo de tipo hidroxamato, se expresa más activamente cuanto más fuerte es la restricción en hierro impuesta por los quelantes. Además las cepas más virulentas producen mayores cantidades que aquéllas con un menor grado de virulencia. Estos altos niveles de producción de sideróforos en las cepas virulentas, podrían estar relacionados con la capacidad que presentan estas cepas para crecer en suero humano, de anguila y de rodaballo. Ensayos de inducción de proteínas de membrana externa en condiciones de limitación de hierro impuestas por EDDHA o por transferrina, mostraron la presencia de tres proteínas de aproximadamente 82, 85 y 28 kDa, y de una banda adicional de 89 kDa en las membranas de las células crecidas con EDDHA como quelante de hierro. Aunque se desconoce el papel de las proteínas de membrana inducidas, las de mayor tamaño podrían estar implicadas en el sistema de captación del complejo hierro-sideróforo (Fouz *et al.*, 1997).

Además, estas cepas poseen receptores que les permiten captar hierro a partir del grupo hemo. Como se mencionó anteriormente, los genes involucrados en la captación de grupos hemo en *P. damselae* ya han sido descritos (Río *et al.*, 2005). En la subespecie *damselae* se ha demostrado que las cepas no degradan proteolíticamente la hemoglobina sino que captan el grupo hemo directamente por interacción célula-Hb (Fouz *et al.*, 1997). Las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* presentan la capacidad de producir hemolisinas en condiciones de exceso de hierro, lo que proporcionaría una fuente adicional de hemoglobina (Hb) en medios con sangre. Este hecho podría estar relacionado con la expresión de un receptor de grupo hemo en condiciones tanto de déficit, como de exceso de hierro (Fouz *et al.*, 1994). También se ha comprobado que la adición de una fuente de hierro (citrato, hemina o hemoglobina) aumenta la susceptibilidad del pez a ser infectado por cepas de *P. damselae* subsp. *damselae*, reduciendo su  $DL_{50}$ , y demostrando que el hierro es esencial para que un microorganismo patógeno pueda establecer una infección en un organismo hospedador (Fouz *et al.*, 1994).

## 5.2 Presencia de material exopolisacárido (cápsula)

La cápsula polisacáridica se encuentra en la superficie celular de un amplio rango de especies bacterianas. Debido a que es la capa más externa de la célula puede mediar interacciones entre la bacteria y el ambiente en el que se encuentra, constituyendo un factor de virulencia de muchos patógenos de plantas y animales (Moxon & Kroll, 1990). Los polisacáridos de la cápsula están compuestos de repetidas unidades de monosacáridos y su unión a la bacteria se realiza por medio de enlaces glucosídicos con fosfolípidos o moléculas del lípido A (Whitfield & Valvano, 1993). La composición de la cápsula polisacáridica presenta una gran diversidad, no sólo en la composición de los monosacáridos, sino en cómo éstos están unidos; esta variabilidad genera un gran número de serotipos capsulares, por ejemplo, *Escherichia coli* puede producir alrededor de 80 polisacáridos capsulares químicamente distintos (Orskov & Orskov, 1992). Se han propuesto una serie de posibles funciones relacionadas con la presencia de la cápsula, como son: formación de biofilm y colonización de varios nichos ecológicos (Costerton *et al.*, 1987), prevención de la desecación (la cápsula actúa como un gel hidratado que rodea a la bacteria (Roberson & Firestone, 1992)) y resistencia a las defensas inmunes de tipo específico (dado su bajo poder inmunogénico protege a la bacteria contra la fagocitosis) e inespecífico (actúa como barrera a los componentes del complemento, enmascarando la superficie celular proporcionando protección frente a la acción bactericida del suero) del hospedador (Roberts *et al.*, 1989; Jacques *et al.*, 1993).

Las cepas de *P. damselae* subsp. *piscicida* sintetizan gran cantidad de material capsular de naturaleza polisacáridica (Bonet *et al.*, 1994). Dicha cantidad depende de la disponibilidad de hierro y la fase de crecimiento en la que se encuentre el cultivo (do Vale *et al.*, 2001). Estudios basados en la supervivencia de cepas de la subsp. *piscicida* a la acción bactericida del suero de dorada, demostraron que aquellas cepas que presentaban cápsula eran más resistentes al suero, persistían más tiempo en el organismo hospedador y presentaban dosis letales más bajas que aquellas que carecían de cápsula. Además, si se inducía la formación de cápsula en aquellas cepas que carecían de la misma, sus dosis letales disminuían sensiblemente (4-5 logs menos) (Magariños *et al.*, 1996a). También se ha podido comprobar que la cápsula provoca

una reducción del porcentaje de fagocitosis mediada por macrófagos (Arijo *et al.*, 1998; Acosta *et al.*, 2006). Se ha demostrado que el nivel de encapsulación juega un papel importante en la adherencia de esta bacteria, ya que aunque la cápsula constitutiva de las cepas virulentas no interfiere en la adherencia celular, sí que un engrosamiento de la misma provoca una disminución en la adherencia a los tejidos del hospedador (Magariños *et al.*, 1996a). Hasta la fecha no se ha descrito producción de cápsula polisacáridica en la subespecie *damselae*.

### **5.3 Factores de adherencia e invasión celular**

La adhesión, además de jugar un papel crítico en ambientes acuáticos donde la adherencia es fundamental para resistir la extracción de la bacteria por fuerzas hidrodinámicas, también juega un importante papel como factor de virulencia en la patogenicidad bacteriana, ya que promueve la liberación de toxinas bacterianas y precede a la penetración de las células del hospedador. La capacidad de adherencia de las bacterias patógenas está mediada por macromoléculas que colectivamente reciben el nombre de adhesinas. Las adhesinas permiten a la bacteria reconocer y unirse específicamente a un amplio espectro de motivos moleculares de proteínas de la superficie celular del organismo hospedador. Muchas adhesinas son proteínas individuales localizadas en la superficie bacteriana, como es el caso de las adhesinas autotransportadas, aunque la mayoría de ellas están organizadas formando delgados hilos dando lugar a las denominadas fimbrias, más comúnmente usadas para describir a aquellos *pili* destinados a la unión de la bacteria a una determinada superficie (Klemm *et al.*, 2010). *P. damsela* subsp. *piscicida*, al igual que la subespecie *damsela*, muestra unos niveles débiles o moderados de adherencia a células de peces, y su capacidad de adhesión es dependiente del tipo de línea celular, mostrando un mayor grado de adhesión a los intestinos de peces como rodaballo, dorada o lubina. Dado que los niveles de adhesión a distintos tipos de líneas celulares fueron similares, no se puede establecer una relación entre la capacidad de adhesión y el grado patogénico de las cepas (Magariños *et al.*, 1996b). La adherencia a los diferentes tipos celulares es inhibida por calor o la adición de azúcares, sin embargo la presencia de anticuerpos contra el lipopolisacárido o de proteasas no afecta a la capacidad de adherencia. Esto sugiere que las moléculas involucradas en el proceso de adhesión podrían ser

componentes de naturaleza glucoproteica o pertenecientes a la superficie celular bacteriana (Magariños *et al.*, 1996b).

Las bacterias patógenas han desarrollado mecanismos para poder invadir las células del hospedador que no son naturalmente fagocíticas, como es el caso de las células epiteliales o las células endoteliales de vasos sanguíneos (Falkow *et al.*, 1992). Esto les permite acceder al torrente sanguíneo o a diferentes partes del cuerpo. Además las células proporcionan un ambiente idóneo para evitar las defensas del hospedador. Esta invasión puede ser mediada por la unión de la bacteria a receptores celulares, que normalmente están implicados en adherencia de la célula a la matriz o a interacciones con otras células, o bien mediante la traslocación de proteínas bacterianas que son inyectadas mediante sistemas de secreción de tipo III al interior celular (He, 1998). Estas proteínas dan lugar a reorganizaciones en la membrana plasmática que provocan la internalización del organismo patógeno (Pizarro-Cerdá & Cossart, 2006). Un ejemplo de unión a receptores celulares son las invasinas, descritas por primera vez en *Yersinia* (Isberg *et al.*, 1987), y son proteínas que imitan estructuralmente a los ligandos normales de las integrinas. Esta unión provoca la formación de una vacuola que engulle a la bacteria al interior celular a modo de cremallera, y el proceso conlleva una serie de reorganizaciones del citoesqueleto que dan lugar a la internalización de la vacuola. Como ocurre en el caso de *Mycobacterium*, la bacteria una vez internalizada puede dividirse en el interior vacuolar, ya que gracias a la modificación del citoesqueleto de actina, la vacuola no sigue su proceso de maduración normal, no se fusiona con los lisosomas y de esta manera se evitan sus actividades bacteriolíticas (Guerin & de Chastellier, 2000). También, como ocurre en el caso de *Listeria* o *Shigella*, pueden lisar la vacuola, aprovecharse del citoesqueleto de actina y dividirse en el citoplasma (Goldberg, 2001). *P. damsela* subsp. *piscicida* es capaz de invadir y permanecer viable al menos hasta dos días dentro de las células infectadas, donde las células podrían proporcionar un ambiente protector frente a los mecanismos de defensa del organismo hospedador o agentes antimicrobianos externos como antibióticos.

*P. damsela* subsp. *piscicida* puede proliferar dentro de macrófagos sin sufrir cambios morfológicos aparentes (Noya *et al.*, 1995). Aunque se ha demostrado que *P.*

*damselae* subsp. *piscicida* puede sobrevivir y multiplicarse satisfactoriamente dentro de macrófagos de lubina rallada (Elkamel *et al.*, 2003) y es capaz de provocar apoptosis de macrófagos y neutrófilos peritoneales de lubina (do Vale *et al.*, 2003), se ha comprobado que los macrófagos pueden dañarlas, ya que no son capaces de sobreponerse al estrés oxidativo generado por los macrófagos (Barnes *et al.*, 1999). La invasión de otros tipos celulares como alternativa a los macrófagos, garantizaría su permanencia en los tejidos infectados. La internalización de *P. damselae* subsp. *piscicida* en células epiteliales de pez es un proceso mediado por interacciones de tipo ligando-receptor, donde tanto la célula epitelial como la bacteria están involucradas (López-Doriga *et al.*, 2000). La célula muestra un papel activo ya que la internalización de la bacteria es inhibida por citocalasina D, indicando que dicha internalización requiere mecanismos dependientes de microfilamentos de actina (Magariños *et al.*, 1996b; Acosta *et al.*, 2009).

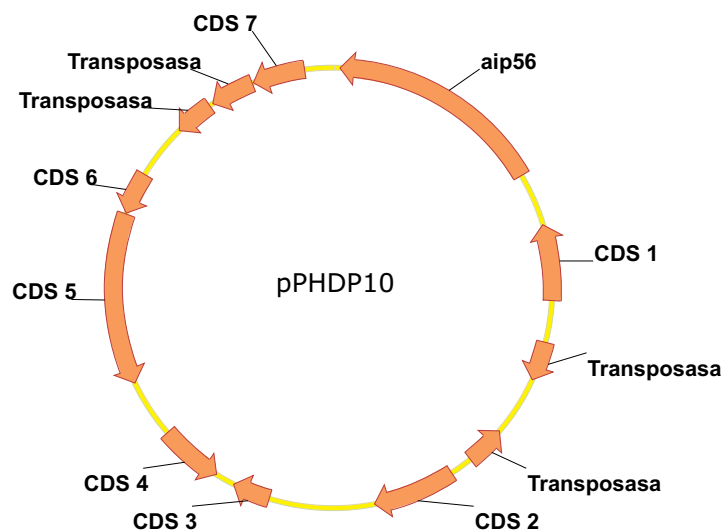
Análisis basados en microscopía electrónica de transmisión muestran que *P. damselae* subsp. *piscicida* es ingerida por un proceso endocítico mediado por vacuolas. Este proceso no requiere viabilidad en la células de *P. damselae* subsp. *piscicida*, pero sí requiere una integridad de sus componentes de superficie que permitan la interacción de la bacteria con la superficie celular del hospedador. Una vez en el interior de la célula hospedadora, no hay evidencias de multiplicación intracelular, ya que no se aprecian células en el citoplasma, pero sí extracelularmente, ya que la replicación parece ocurrir cuando la bacteria ha dejado la célula hospedadora mediante lisis celular (López-Doriga *et al.*, 2000).

La subespecie *damselae* muestra valores débiles o incluso negativos de adherencia tanto para células de peces como de mamíferos, de tal manera que no se pudo establecer una relación entre el grado de patogenicidad y potencial invasivo.

## 5.4 Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN circular extracromosómico que portan genes involucrados en diversas funciones como detoxificación, virulencia, interacciones ecológicas y resistencia a antibióticos. Además, debido a su capacidad de ser transmitidos por transferencia horizontal a otras especies bacterianas, son una fuente muy importante para la adquisición de nuevos genes (Smillie *et al.*, 2009). Se ha demostrado la existencia de plásmidos en las dos subespecies de *P. damsela*. En el caso de la subsp. *piscicida*, un análisis del contenido plasmídico demostró que aquellas cepas de procedencia europea y americana presentaban tres plásmidos de 50, 20 y 7 MDa (Magariños *et al.*, 1992a). Las cepas de procedencia japonesa muestran un perfil plasmídico diferente a las cepas de procedencia americana y europea, portando de tres a siete plásmidos, siendo los más representativos aquellos que presentan pesos moleculares de 37, 15 y 5 MDa (Toranzo *et al.*, 1983). Estos plásmidos de las cepas de origen japonés se caracterizan por ser plásmidos conjugativos que portan numerosos genes de resistencia a antibióticos como kanamicina, cloranfenicol, sulfonamida, trimetoprim y tetraciclina (Kim *et al.*, 2008). La aparición de estos plásmidos conjugativos puede ser debida a la presión selectiva ejercida por el uso de estos agentes quimioterápicos para el tratamiento de enfermedades infecciosas en peces de interés económico para la acuicultura (Aoki, 1988). Es común encontrar genes de resistencia a antibióticos de origen plasmídico en las cepas de la subsp. *piscicida*, aunque se han encontrado genes de resistencia a antibióticos de origen no plasmídico, como es el caso de la resistencia a tetraciclina en un elemento integrativo y conjugativo (ICE) que además es capaz de movilizar plásmidos de virulencia (Osorio *et al.*, 2008). Un análisis comparativo entre cepas virulentas y no virulentas de diferentes lugares geográficos mostró la ausencia de un fenotipo virulento asociado al contenido plasmídico (Magariños *et al.*, 1992a). Sin embargo, posteriormente se demostró la existencia de plásmidos implicados en la virulencia de este patógeno. Un análisis con cepas virulentas de *P. damsela* subsp. *piscicida* procedentes de diferentes orígenes geográficos, mostró la presencia de actividad apoptótica frente a macrófagos y neutrófilos de lubina. Posteriormente se comprobó que dicha actividad residía en un plásmido de 9.631 pb denominado pPHDP10 (Figura 1.8) (do Vale *et al.*, 2003). pPHDP10 se encuentra en muchas cepas virulentas de la subsp. *piscicida*, y sin

embargo se encuentra ausente en cepas avirulentas. El papel en la virulencia que juega este plásmido radica en la presencia del gen *aip56* en su secuencia. Este gen codifica una toxina con capacidad apoptótica, por lo que la secreción de esta exotoxina puede considerarse como un mecanismo de virulencia común a las cepas virulentas de *P. damsela* subsp. *piscicida*.



**Figura I.8:** Mapa físico del plásmido de *P. damsela* subsp. *piscicida* pPHDP10.

El análisis del contenido plasmídico de la subsp. *damsela* reveló una gran diversidad, mostrando plásmidos cuyos tamaños abarcaban desde los 3 MDa hasta 100 MDa, y dada esta variedad, no se pudo establecer una relación entre el contenido plasmídico y la virulencia (Pedersen *et al.*, 1997). Sin embargo, otro análisis reveló la presencia de un plásmido de 100 MDa exclusivo de aislados procedentes de rodaballo, por lo que este plásmido podría estar involucrado en la virulencia de estos aislados (Fouz *et al.*, 1992). Otros autores observaron que las cepas que presentaban una mayor actividad hemolítica mostraban una banda de ADN plasmídico de la que carecían aquellas cepas menos hemolíticas, por lo que proponen una relación entre la actividad hemolítica y el contenido plasmídico (Takahashi *et al.*, 2008), y dado que la hemólisis es un factor de virulencia, el contenido plasmídico podría jugar un papel importante en la virulencia de esta bacteria.

## 5.5 Exotoxinas

Un factor de virulencia hace referencia a un producto bacteriano o estrategia que contribuye a la virulencia o patogenicidad. Los productos extracelulares secretados por una amplia gama de bacterias patógenas constituyen importantes factores de virulencia que contribuyen al desarrollo de la enfermedad o permiten a la bacteria contraatacar los mecanismos de defensa del hospedador. Estos productos incluyen enterotoxinas, hemolisinas, citotoxinas, proteasas, sideróforos, factores adhesivos y hemagglutininas. De ellos, enterotoxinas, hemolisinas y citotoxinas son factores tóxicos que causan síntomas directos, en cambio sideróforos y factores adhesivos juegan un papel indirecto en el establecimiento de la infección.

### **5.5.1 Exotoxinas producidas por *P. damsela* subsp. *piscicida***

Se ha visto que *P. damsela* subsp. *piscicida* produce altos niveles de lipopolisacáridos y proteínas con diferentes actividades enzimáticas en sus productos extracelulares. Estas actividades no se deben a la presencia del componente lipopolisacárido, ya que las actividades se pierden después de un tratamiento mediante calor (100 °C, 10 min.). El número de actividades enzimáticas detectadas en los productos extracelulares fue menor que el obtenido con células vivas, lo que sugiere que muchas de ellas residen en la envoltura celular o que algunos substratos son internalizados (Magariños *et al.*, 1992b). Estas actividades proteolíticas difieren entre cepas, ya que solamente los aislados de Japón e Italia son capaces de hidrolizar caseína y gelatina. También se detectaron actividades hemolíticas para eritrocitos de oveja y rodaballo, y sobre todo una actividad fosfolipasa común a todas las cepas testadas. Se ha demostrado que *P. damsela* subsp. *piscicida* produce una fosfolipasa que presenta actividad hemolítica frente eritrocitos de pez y una hemólisis indirecta mediante la adición de lecitina frente a eritrocitos de diferentes especies de mamíferos (Naka *et al.*, 2007), por lo que estas actividades detectadas en los productos extracelulares podrían estar relacionadas. Por otra parte, en otros estudios se determinó que todos los productos extracelulares procedentes de cepas de la subsp. *piscicida* con diferente origen geográfico eran citotóxicos y producían cambios degenerativos en células de pez y líneas celulares de homeotermos (Magariños *et al.*, 1992b; Poulos *et al.*, 2004), si bien la cantidad de productos extracelulares necesarios



para provocar una respuesta citotóxica varió según la procedencia geográfica de las cepas, siendo las cepas de procedencia americana, francesa y española las que necesitaron menor cantidad de productos extracelulares para causar efecto citopático. Ello sugiere la existencia de una diferente composición de los productos extracelulares entre cepas.

Una de las estrategias utilizadas por las bacterias patógenas para evadir la fagocitosis, es la utilización de moléculas que eficientemente matan los fagocitos del organismo hospedador (DeLeo, 2004). *P. damsela* subsp. *piscicida* es capaz de evitar los mecanismos de fagocitosis para causar enfermedad mediante la producción de grandes cantidades de AIP56 (proteína inductora de la apoptosis de 56 kDa, codificada en el plásmido de virulencia pPHDP10). El mecanismo involucrado en la apoptosis es altamente eficiente, y comprende la lisis de los fagocitos mediante necrosis secundaria posterior a la apoptosis (do Vale *et al.*, 2003). Se ha observado que la inmunización pasiva de lubinas con anticuerpos anti-AIP56 proporciona inmunidad frente a *P. damsela* subsp. *piscicida*, lo que demuestra el papel clave que juega esta toxina en la virulencia de esta bacteria (do Vale *et al.*, 2005). Además de AIP56, recientemente se ha descubierto que *P. damsela* subsp. *piscicida* es capaz de secretar una proteasa que presenta toxicidad para cobia (*Rachycentron canadum*) (Liu *et al.*, 2011b).

#### **5.5.2 Exotoxinas producidas por *P. damsela* subsp. *damsela***

Los productos extracelulares de *P. damsela* subsp. *damsela* presentan un perfil enzimático muy similar a aquel que presentan las células vivas, por lo que la mayoría de las actividades están asociadas a exoenzimas. Los productos extracelulares mostraron siete actividades enzimáticas: fosfatasa alcalina, esterasa, esterasa-lipasa, leucina arilamidasa, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa y N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa. No se detectó producción de enzimas proteolíticos, sin embargo se encontraron importantes actividades polisacaridolíticas (condroitinasa e hialuronidasa), lipolíticas (lipasa y fosfolipasa) y hemolíticas (frente a eritrocitos de peces y mamíferos) (Fouz *et al.*, 1993). Los productos extracelulares se caracterizaron por ser citotóxicos para líneas celulares de homeotermos y de peces, provocando cambios degenerativos y lisis celular, pero la toxicidad producida varió según la cepa testada, pudiéndose establecer tres grupos según el nivel de actividades biológicas

desplegadas por los productos extracelulares, el grado de citotoxicidad celular y la dosis letal mostrada. Aquel grupo de cepas (aisladas de rodaballo y humano) que presenta un mayor nivel de actividades biológicas en los productos extracelulares se caracteriza principalmente por presentar altos valores de actividad fosfolipásica, hemolítica y las dosis letales más bajas, estableciéndose una relación directa entre la actividad hemolítica, toxicidad celular y el grado de virulencia. Además, estos fuertes valores de actividad hemolítica obtenidos *in vitro* se correlacionan con la presencia de amplias áreas hemorrágicas en músculo y boca observadas en los peces afectados (Fouz *et al.*, 1993).

#### **5.5.2.1 Damselisina: Una fosfolipasa D con actividad hemolítica**

En 1984, se observó una correlación entre la capacidad de 19 aislados de *P. damsela* subsp. *damsela* de producir *in vitro* grandes cantidades de una citolisina y causar enfermedad en ratón (Kreger, 1984). Los valores de producción de dicha citolisina variaron ampliamente entre los aislados. Cinco de ellos mostraron unos valores sensiblemente más altos que el resto, y se correspondieron con las dosis letales para ratón más bajas. Se observó que la citolisina presentaba actividad hemolítica frente a 16 especies de animales, y resultó ser muy activa frente a eritrocitos de ratón y rata. En trabajos posteriores, a partir de una fracción purificada, se determinó que la toxina presentaba un peso molecular de 69 kDa (Kothary & Kreger, 1985). Dicha fracción fue nuevamente muy activa frente a eritrocitos de ratón, pero a diferencia de fracciones menos purificadas sólo fue activa frente a eritrocitos de cuatro especies de animales, lo que ponía de manifiesto la presencia de otras proteínas adicionales con actividad hemolítica. Este aspecto se correlacionó con los resultados obtenidos mediante isoelectroenfoque de capa fina que mostraron la presencia de tres bandas, una mayoritaria y dos minoritarias, que en análisis posteriores resultaron ser hemolíticamente activas (Kothary & Kreger, 1985). Esta toxina, bautizada con el nombre de damselisina, presenta actividad fosfolipasa D frente a esfingomielina, y al igual que otras esfingomielinasas, actúa sinérgicamente con la delta-toxina estafilocócica frente a eritrocitos de oveja (Kreger *et al.*, 1987). Posteriormente, estudios de hibridación de ADN mediante Southern blot revelaron la ausencia del gen de la damselisina en todas las cepas de diferentes especies de *Vibrio*

testadas, y en el caso de *P. damsela* subsp. *damsela* sólo se halló presente en las cepas que presentaban los valores más altos de actividad hemolítica (Cutter & Kreger, 1990). Aunque el gen que codifica la damselisina fue clonado y expresado en *E. coli*, su contexto genético permanece desconocido hasta la fecha. Cutter y Kreger (1990), descartaron que el gen de la damselisina estuviese en un plásmido, y propusieron que forma parte de un profago, ya que cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* altamente hemolíticas espontáneamente perdían el gen de la damselisina, así como las secuencias flanqueantes, reduciéndose sensiblemente su actividad hemolítica.

Dado que la damselisina presenta actividad hemolítica y fosfolipásica, y que las actividades hemolíticas y fosfolipásicas fueron especialmente altas en los productos extracelulares de las cepas más virulentas, hay que considerar a la damselisina como uno de los principales factores de virulencia producidos por *P. damsela* subsp. *damsela*, aunque la presencia del gen de la damselisina no es un prerrequisito para la actividad hemolítica ni para la patogenicidad (Osorio *et al.*, 2000), ya que las cepas que carecen del gen de la damselisina son capaces de producir hemólisis y provocar enfermedad en peces y ratón. Este aspecto demuestra la presencia de otros factores de virulencia, además de la damselisina, en los productos extracelulares.

## **5.6 *P. damsela*: perspectivas futuras**

*P. damsela* comprende dos subespecies con características fenotípicas claramente diferentes. La subsp. *piscicida* muestra un rango de hospedadores mucho más limitado restringiéndose prácticamente a ser patógena de peces. En cambio la subsp. *damsela* presenta un mayor rango de hospedadores, siendo patógena tanto de especies poiquilothermas como de especies homeothermas en las que se incluye el hombre. Estas diferencias a nivel de hospedador implican diferencias en otros aspectos como la temperatura de crecimiento (sólo la subsp. *damsela* crece a 37 °C) o los factores de virulencia. El conocimiento actual sobre los factores de virulencia en esta especie parece sugerir que la transferencia horizontal ha jugado un papel importante en la adquisición de algunos de estos factores. AIP56, codificada en pPHDP10 o la damselisina, cuyo origen genético parece estar relacionado con elementos móviles, son ejemplos claros de cómo la transferencia horizontal ha influido en la adquisición de nuevos factores de virulencia. Es tentador sugerir que una serie de elementos

móviles como transposones, plásmidos, ICEs o fagos hayan participado activamente en la diferenciación de estas subespecies mediante la pérdida o ganancia de nuevas secuencias de ADN. A lo largo de este trabajo intentaremos esclarecer la base genética que se esconde tras algunas de las diferencias fenotípicas que presentan las dos subespecies de *Photobacterium damsela*.

## II. Objetivos



Tal y como hemos expuesto en la introducción general, las subespecies *damselae* y *piscicida* de la especie *Photobacterium damsela* se diferencian en un conjunto de características fenotípicas. Dichas diferencias afectan, además de a características morfológicas y metabólicas, al rango de hospedadores y al tipo de patología producida, y sugieren la presencia de mecanismos de virulencia diferenciales.

Es por ello que en la realización de este trabajo nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- 1.- Identificar genes regulados por hierro y caracterizar los determinantes genéticos del sistema de captación de sideróforos en ambas subespecies.
- 2.- Identificar genes específicos implicados en las diferencias fenotípicas existentes entre las dos subespecies.
- 3.- Caracterizar la base genética de la actividad hemolítica de *P. damsela* subsp. *damsela*.
- 4.- Analizar la diversidad intraespecífica de los determinantes genéticos, tanto plasmídicos como cromosómicos, de la actividad hemolítica de *P. damsela* subsp. *damsela*.
- 5.- Estudiar el papel que la actividad hemolítica juega en el proceso infeccioso de *P. damsela* subsp. *damsela* en ratón y rodaballo.





### III. Materiales y métodos



## 1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las características de las cepas y plásmidos empleados en este trabajo, así como sus derivados, se describen en las Tablas III.1 y III.2. De manera rutinaria las cepas de *Photobacterium damsela* se cultivaron a 25 °C en agar de soja triptona (Difco) suplementado con NaCl a una concentración final de 1% (p/v) en placa (TSA-1), o en caldo de soja triptona (Pronadisa) suplementado con un 1% de NaCl para los cultivos líquidos (TSC-1). Las cepas de *Escherichia coli* se cultivaron rutinariamente a 37 °C en medio Luria Bertani (LB) (Pronadisa) en placa, y en caldo LB (Pronadisa) para los cultivos líquidos. Todas las cepas se mantuvieron a -80 °C en medio TSC-1 suplementado con un 20% (v/v) de glicerol.

En los casos en los que fue necesario se añadieron al medio de cultivo los antibióticos a unas concentraciones finales de: ampicilina (Amp) 50 µg/mL (disolución stock 50 mg/mL en agua); kanamicina (Kan) 50 µg/mL (disolución stock 50 mg/mL en agua); gentamicina (Gm) 10 µg/mL (disolución stock 10 mg/mL en agua); rifampicina (Rif) 50 µg/mL (disolución stock 50 mg/mL en DMSO); tetraciclina (Tet) 4 µg/mL (disolución stock 12 mg/mL en etanol al 70%); cloranfenicol (Cm) 20 µg/mL (disolución stock 20 mg/mL en etanol 100%). Las disoluciones de antibióticos se esterilizaron mediante filtración utilizando filtros de 0,2 µm (Millipore) y se guardaron a 4 °C.

El control del crecimiento de los cultivos líquidos se realizó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (medida en un espectrofotómetro Hitachi U-2000) según los tiempos de incubación requeridos por el experimento. En las pruebas de crecimiento se utilizó el medio mínimo CM9 con la siguiente composición: sales M9 (Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H 6 g/L; KPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 3 g/L; NaCl 5 g/L; NH<sub>4</sub>Cl 10 mg/L); glucosa 0,25%; casaminoácidos 0,2%; CaCl<sub>2</sub> 0,01 mM y MgSO<sub>4</sub> 0,1 mM (Lemos *et al.*, 1988).

**Tabla III.1:** Cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Característica(s) destacable(s)	Referencia/Origen
<b><i>P. damselae</i> subsp. <i>piscicida</i></b>		
EPOY8803II	Avirulenta	Mero, Japón
ATCC 29690	Avirulenta	Seriola, Japón
P3333	Virulenta	Seriola, Japón
P3335	Virulenta	Seriola, Japón
MP7801	Virulenta	Seriola, Japón
MZS8001	Virulenta	Seriola, Japón
10831	Virulenta	Lubina, Francia
PC554.2	Virulenta	Lenguado, España
DI-21	Virulenta	Dorada, España
AR83	PC554.2 que adquirió PHDD1 por conjugación de AR61 y posteriormente se seleccionó la pérdida del vector suicida	Este trabajo
<b><i>V. anguillarum</i></b>		
775	Serotipo 01	(Crosa <i>et al.</i> , 1977)
775met11	Serotipo 01, cepa defectiva en la proteína Fur	(Tolmasky <i>et al.</i> , 1994)
AR4	<i>V. anguillarum</i> 775 con pAJR4	Este trabajo
AR6	<i>V. anguillarum</i> 775met11 con pAJR4	Este trabajo
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5α	<i>supE4 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsd R17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Colección propia
S17-1-λpir	<i>recA, thi, pro, hsdR-M+RP4: 2-Tc:Mu: Km Tn7 λpir, Tp<sup>R</sup> Sm<sup>R</sup></i>	(Herrero <i>et al.</i> , 1990)
XL1-Blue MR	<i>Δ(mcrA ) 183Δ(mcrCB-hsdS<sub>mr</sub>-mrr ) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i>	Stratagene
H1717	<i>araD139 rpsL150 D(argF-lac) relA1 U169 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR aroB fhuF :: λplacMu</i>	(Hantke, 1987)
AR73	DH5α con pAJR27 y pAJR29	Este trabajo
AR152	DH5α con pAJR27, pAJR29 y pAJR55	Este trabajo
AR153	DH5α con pAJR26 y pAJR55	Este trabajo
<b><i>Streptococcus agalactiae</i></b>		
AR170	Microbiota de piel de rata	Este trabajo
<b><i>Vibrio cholerae</i></b>		
N16961		(Heidelberg <i>et al.</i> , 2000)
<b><i>Aeromonas shubertii</i></b>		
TL3B0B		Lubina, Turquía
<b><i>Rhodococcus equi</i></b>		
CECT555		Colección de cepas tipo, España
<b><i>P. damselae</i> subsp. <i>damselae</i></b>		
RM-71	Altamente virulenta	Rodaballo, España
RG-91	Altamente virulenta	Rodaballo, España
RG-153	Altamente virulenta	Rodaballo, España
RG-214	Altamente virulenta	Rodaballo, España
CDC-2227-81	Altamente virulenta	Humano, EE.UU.
ATCC 33539	Moderadamente virulenta	Pez ángel, EE.UU.
LD-07	Levemente virulenta	Palometa, España
340	Levemente virulenta	Agua de mar, España
309	Levemente virulenta	Mejillón, España
158	Levemente virulenta	Anguila, Bélgica
162	Levemente virulenta	Anguila, Bélgica
PG-801	Levemente virulenta	Camarón, Taiwán
192	Levemente virulenta	Delfín, EE. UU.
ATCC 35083	Levemente virulenta	Tiburón, EE. UU.

Tabla III.1: Cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Característica(s) destacable(s)	Referencia/Origen
J3G801	Levemente virulenta	Camarón, Taiwán
PC586.1	Levemente virulenta	Palometa, España
AR57	RM-71 mutante espontáneo a rifampicina	Este trabajo
AR59	ATCC 33539 mutante espontáneo a rifampicina	Este trabajo
AR61	1ª inserción de la construcción del mutante del gen <i>dly</i>	Este trabajo
	sobre AR57, Kan <sup>r</sup>	
AR64	AR57 $\Delta dly$	Este trabajo
AR65	1ª inserción de la construcción del mutante del gen de la O-metiltransferasa sobre AR57, Kan <sup>r</sup>	Este trabajo
AR67	1ª inserción de la construcción del mutante del gen <i>hlyA</i> <sup>pl</sup>	Este trabajo
	sobre AR57 (no crece a 37 °C y no produce HlyA <sup>cr</sup> ), Kan <sup>r</sup>	
AR68	AR57 $\Delta O$ -metiltransferasa	Este trabajo
AR72	AR57 $\Delta hlyA$ <sup>pl</sup> ( no crece a 37 °C y no produce HlyA <sup>cr</sup> )	Este trabajo
AR76	1ª inserción de la construcción del mutante doble de los genes <i>dly</i> y <i>hlyA</i> <sup>pl</sup> sobre AR57, Kan <sup>r</sup>	Este trabajo
AR78	AR57 $\Delta dly$ - <i>hlyA</i> <sup>pl</sup>	Este trabajo
AR80	1ª inserción de la construcción del mutante triple de los genes <i>dly</i> , <i>hlyIII</i> y <i>hlyA</i> <sup>pl</sup> sobre AR78, Kan <sup>r</sup>	Este trabajo
AR82	AR57 $\Delta dly$ - <i>hlyIII</i> - <i>hlyA</i> <sup>pl</sup>	Este trabajo
AR97	AR59 complementada con el gen <i>hlyA</i> <sup>pl</sup> de la cepa RM-71 clonado en pHRP309	Este trabajo
AR98	Mutante por inserción del gen <i>hlyA</i> <sup>cr</sup> sobre la cepa AR78	Este trabajo
AR99	AR57 complementada con el gen <i>dly</i> de la cepa RM-71 clonado en pHRP309	Este trabajo
AR100	1ª inserción de la construcción del mutante del gen <i>fhuE</i>	Este trabajo
	sobre AR57, Kan <sup>r</sup>	
AR105	AR57 $\Delta fhuE$	Este trabajo
AR111	LD-07 mutante espontáneo a rifampicina	Este trabajo
AR112	AR111 mutante por inserción <i>hlyA</i> <sup>cr</sup>	Este trabajo
AR118	1ª inserción de la construcción del mutante del gen <i>hlyA</i> <sup>cr</sup> sobre AR64, Kan <sup>r</sup>	Este trabajo
AR119	AR64 $\Delta dly$ - <i>hlyA</i> <sup>cr</sup>	Este trabajo
AR123	1ª inserción de la construcción del mutante del gen <i>hlyA</i> <sup>cr</sup> sobre AR57, Kan <sup>r</sup>	Este trabajo
AR129	AR57 $\Delta hlyAcr$	Este trabajo
AR132	1ª inserción de la construcción del mutante del gen <i>hlyA</i> <sup>pl</sup> sobre AR57, Kan <sup>r</sup>	Este trabajo
AR133	AR57 $\Delta hlyApl$	Este trabajo
AR150	AR57 complementada con el gen <i>hlyA</i> <sup>cr</sup> de la cepa RM-71 clonado en pHRP309	Este trabajo
AR151	AR59 complementada con el gen <i>hlyA</i> <sup>cr</sup> de la cepa RM-71 clonado en pHRP309	Este trabajo
AR157	1ª inserción de la construcción del mutante del gen <i>hlyA</i> <sup>cr</sup> sobre AR133, Kan <sup>r</sup>	Este trabajo
AR158	AR57 $\Delta hlyApl-hlyAcr$	Este trabajo

Las categorías de virulencia se han establecido en base a la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>). En la subsp. *damselae*: avirulentas (DL<sub>50</sub>≥10<sup>8</sup>), moderadamente virulentas (DL<sub>50</sub>≥10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup>) y altamente virulentas (DL<sub>50</sub>≥10<sup>2</sup>-10<sup>5</sup>) (Fouz *et al.*, 1994). En la subsp. *piscicida*: avirulenta (DL<sub>50</sub>≥10<sup>7</sup>) y virulenta (DL<sub>50</sub>≥10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup>) (Magariños *et al.*, 1992b).

**Tabla III.2:** Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmidos	Característica(s) destacable(s)	Referencia
pGEM-T Easy	Vector de clonación de productos de PCR, Amp <sup>r</sup>	Promega
pKD4	Vector de clonación, Kan <sup>r</sup>	(Datsenko & Wanner, 2000)
pT7-7	Vector de clonación, Amp <sup>r</sup>	Promega
pWKS30	Vector de clonación de bajo nº de copia, Amp <sup>r</sup>	(Tabor & Richardson, 1985)
pNidia	Plásmido suicida derivado de pCVD442, <i>pir</i> , Amp <sup>r</sup>	(Wang & Kushner, 1991)
pNidkan	Plásmido suicida derivado de pCVD442, <i>pir</i> , Kan <sup>r</sup>	(Donnenberg & Kaper, 1991)
pHRP309	Vector de clonación de bajo nº de copia, Gm <sup>r</sup>	(Mouriño <i>et al.</i> , 2004)
SuperCos	Vector cosmídico, Amp <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup>	(Parales & Harwood, 1993)
pACYC184	Vector de clonación de bajo nº de copia, Cm <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>	Stratagene
PAJR4	pHRP309 fusión <i>O-metiltransferasa::lacZ</i>	Este trabajo
PAJR9	Construcción para mutar el gen de la <i>O-metiltransferasa</i> clonado en el pNidia	Este trabajo
PAJR9 kan	Construcción para mutar el gen de la <i>O-metiltransferasa</i> clonado en el pNidkan	Este trabajo
PAJR23	Construcción para mutar el gen <i>dly</i> clonado en el pNidkan	Este trabajo
PAJR25	Construcción para mutar el gen <i>hlyA<sup>pl</sup></i> clonado en el pNidkan	Este trabajo
PAJR26	pWKS30 con el gen <i>dly</i> de la cepa RM-71 clonado	Este trabajo
PAJR27	pWKS30 con el gen <i>hlyA<sup>pl</sup></i> de la cepa RM-71 clonado	Este trabajo
PAJR29	pACYC184 con el gen <i>dly</i> de la cepa RM-71 clonado	Este trabajo
PAJR30	Construcción para mutar los genes <i>dly-hlyA<sup>pl</sup></i> clonado en el pNidkan	Este trabajo
PAJR32	Construcción para mutar el gen <i>hlyIII</i> clonado en el pNidkan	Este trabajo
PAJR36	Construcción para mutar el gen <i>fhuE</i> clonado en el pNidkan	Este trabajo
PAJR37	Construcción para mutar el gen <i>hlyA<sup>cr</sup></i> por inserción clonado en el pNidkan	Este trabajo
PAJR38	pHRP309 con el gen <i>hlyA<sup>pl</sup></i> de la cepa RM-71 clonado	Este trabajo
PAJR39	pHRP309 con el gen <i>dly</i> de la cepa RM-71 clonado	Este trabajo
PAJR49	Construcción para mutar el gen <i>hlyA<sup>cr</sup></i> clonado en el pNidkan	Este trabajo
PAJR45	pHRP309 fusión <i>hlyA<sup>cr</sup>::lacZ</i>	Este trabajo
PAJR46	<i>oriV</i> pPHDD1 ligado al marcador de Kan de pKD4	Este trabajo
PAJR51	pHRP309 fusión <i>dly::lacZ</i>	Este trabajo
PAJR53	pHRP309 fusión <i>hlyA<sup>pl</sup>::lacZ</i>	Este trabajo
PAJR55	pHRP309 con el gen <i>hlyA<sup>cr</sup></i> de la cepa RM-71 clonado	Este trabajo

## 2. Extracción de ADN

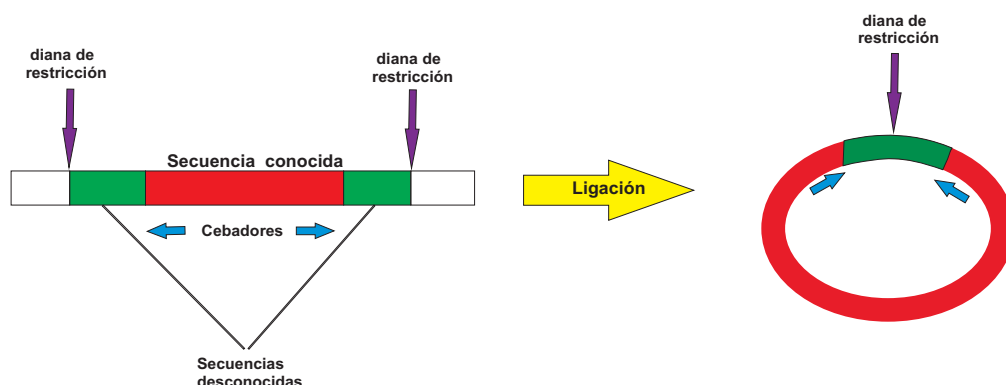
Los protocolos básicos de manipulación de ADN se llevaron a cabo tal y como se describen en Sambrook & Russell (2001). El ADN genómico bacteriano fue extraído utilizando el producto comercial Easy-DNA (Invitrogen). La extracción del contenido plasmídico de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* se llevó a cabo principalmente por el protocolo TENS (Zhou *et al.*, 1990) con pequeñas modificaciones, que incluyeron el uso de 200 mL de acetato de sodio (3 M, pH 4,8) seguido de una incubación de 10 min en hielo, así como una reducción en el número y volumen de las extracciones con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Para la purificación rutinaria de cósmidos, plásmidos, limpieza de restricciones y productos de PCR se utilizaron kits de Qiagen: *QIAfilter™ Plasmid Midi Kit*, *QIAprep® Spin Miniprep Kit*, *QIAquick® PCR Purification Kit* y *QIAquick® Gel Extraction Kit*.

## 3. PCR y PCR Inversa (I-PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en un termociclador de gradiente de temperaturas (T-gradient, Biometra) en volúmenes de 25 y 50 µL según el caso, utilizando 0,5 U de Taq polimerasa *KAPA Taq* (KAPA BIOSYSTEMS), tampón de PCR 10X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 200 µM de cada desoxinucleótido 5' trifosfato (dNTP) (Bioline), y 10 µM de cada cebador. Dependiendo de la T<sub>m</sub> de cada pareja de cebadores, las temperaturas de hibridación oscilaron entre 55 y 60 °C. Los tiempos de elongación utilizados se seleccionaron en función del tamaño esperado del fragmento a amplificar (1 min × kb<sup>-1</sup>). En todas las reacciones de PCR se llevó a cabo un control negativo para garantizar la ausencia de DNA contaminante. Esta reacción de control consta de todos los componentes citados con la excepción del DNA molde. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1% con tampón TAE 1X (Tris 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) con adición de bromuro de etidio (EtBr) a una concentración final de 0,5 µg/mL. Los geles se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Gelprinter Plus) a una longitud de onda de 254 nm, y se fotografiaron con una cámara Scion Corporation.

La PCR inversa (I-PCR) es un método que permite la rápida amplificación *in vitro* de secuencias de ADN desconocidas que flanquean una región de ADN de secuencia conocida. Los cebadores utilizados presentan la característica de estar en

orientaciones opuestas, dirigiéndose hacia dichas secuencias desconocidas. La amplificación se realiza sobre ADN genómico digerido con una enzima de restricción que no corte dentro de la región conocida de ADN y posteriormente autoligado (Figura III.1). De este modo, si la diana de restricción está a una distancia apropiada, podemos amplificar por PCR las regiones que flanquean la región génica conocida para después secuenciarlas y obtener información de las mismas. Para la amplificación por PCR se utilizó el *Expand Long Template PCR System* (Roche) que permite la amplificación de fragmentos de hasta 12 kb.



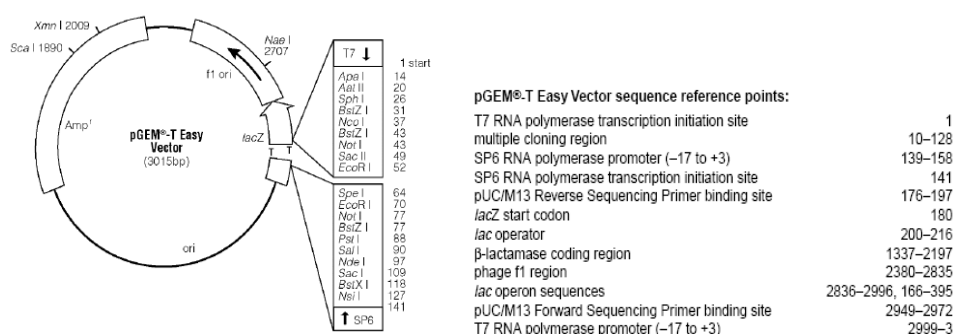
**Figura III.1:** Esquema de la PCR inversa utilizada para amplificar regiones de ADN desconocidas (en verde) adyacentes a una secuencia previamente caracterizada (en rojo). Tras el corte del ADN genómico con una enzima de restricción, los fragmentos obtenidos fueron autoligados y sometidos a una amplificación por PCR utilizando unos cebadores (flechas azules) orientados hacia las secuencias desconocidas.

Para la obtención del molde se actuó de la siguiente manera: las reacciones de digestión (se realizaron varias digestiones con aquellas enzimas de restricción que carecían de diana en la secuencia de ADN conocida), que contenían aproximadamente 2 µg de ADN genómico y 1 U de enzima en un volumen final de 100 µL, se incubaron un mínimo de 6 h a la temperatura óptima. Las reacciones se limpiaron con el *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) para eliminar los restos de enzima y tampón, y se resuspendieron en 25 µL de H<sub>2</sub>O. Se utilizaron estos 25 µL de cada una de las reacciones de digestión como molde para la reacción de autoligación con 1 U de T4-DNA ligasa (Fermentas); 5 µL de tampón de reacción; 5 µL de PEG 4000 al 50% y agua hasta un volumen final de 50 µL. La reacción se incubó a 4°C durante toda la noche y se inactivó a 65 °C durante 10 min. Finalmente se utilizaron 2 y 3 µL de las ligaciones como molde en la reacción de I-PCR.



## 4. Clonación de fragmentos de ADN

Para las reacciones de clonación se utilizaron fragmentos de ADN de dos tipos: (i) productos de PCR y (ii) fragmentos derivados de la digestión con enzimas de restricción. Para clonar productos de PCR se utilizó el *pGEM-T-Easy Vector System* (Promega) (Figura III.2). Previamente a su clonación, las reacciones de PCR se limpiaron con el *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) o bien, en el caso de obtener múltiples fragmentos de amplificación, los fragmentos de interés se purificaron con el *QIAquick Gel extraction kit* (Qiagen) tras su separación electroforética y posterior extracción del gel de agarosa. La relación molar inserto/vector utilizada en la reacción de ligación fue 3:1, con 1 U del enzima T4-DNA ligasa e incubando durante 2 h a temperatura ambiente. Las reacciones se utilizaron para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5α.

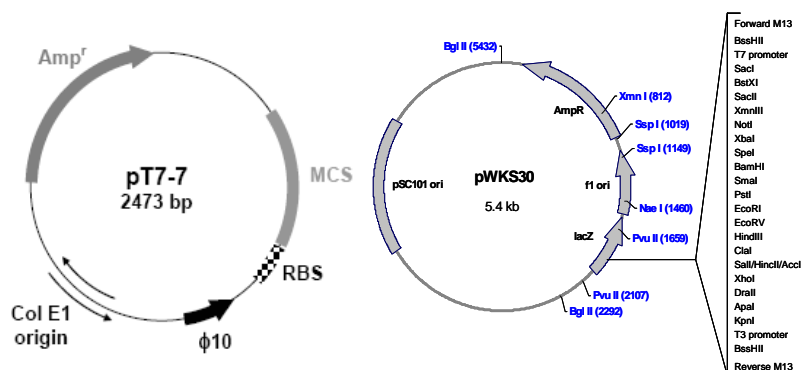


**Figura III.2:** Mapa del plásmido *pGEM-T-Easy* (Promega). Este vector está preparado para la clonación de productos de PCR.

Las colonias positivas para el fragmento clonado se seleccionaron a partir de placas de LB con ampicilina (50  $\mu$ g/mL), isopropil-beta-D-thiogalactopiranosido (IPTG) (Promega) (0,5 mM) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactósido (X-gal) (Promega) (40  $\mu$ g/mL). Las colonias de coloración blanca se reaislaron para su confirmación. Se purificó el plásmido y, tras su digestión con *EcoRI*, el tamaño del fragmento clonado se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

En la clonación de fragmentos de ADN no obtenidos por PCR se siguió la misma relación inserto/vector especificada para el caso anterior. Las reacciones de ligación se diseñaron para un volumen final de 20  $\mu$ L con 1 U de T4-DNA ligasa y 2  $\mu$ L de tampón de reacción 10X (Fermentas). En el caso de fragmentos con extremos romos, las

reacciones se diseñaron para un volumen final de 20 µL con 1 U de T4-DNA ligasa (Fermentas), 2 µL de tampón de reacción 10X (Fermentas) y 2 µL de PEG 4000 al 50%. En cualquier caso, todas las reacciones se incubaron a 4 °C durante toda la noche y se inactivaron a 65 °C durante 10 min previamente a su introducción en la cepa de *E. coli* correspondiente. Los clones recombinantes se seleccionaron en base al marcador de resistencia codificado en el vector (Figura III.3) y se confirmaron por digestión con endonucleasas de restricción y electroforesis en gel de agarosa al 1%.



**Figura III.3:** Mapa de los principales vectores de clonación utilizados en este trabajo. Todos ellos se caracterizan por llevar genes que confieren resistencia a antibióticos, de modo que los clones recombinantes puedan ser fácilmente aislados a partir de su siembra en medios selectivos.

## 5. Transformación de plásmidos en *E. coli*

### 5.1. Transformación por choque térmico

Previamente al proceso de transformación, las células se hicieron “competentes” a la incorporación de ADN exógeno según el siguiente protocolo (Sambrook & Russell, 2001): se inoculó una colonia aislada de un cultivo fresco en 1 mL de LB y se incubó toda la noche a 37 °C con agitación. Con 500 µL de este cultivo se inoculó un matraz con 50 mL de LB, se dejó incubando en agitación a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica (a 600 nm) de 0,4. En ese momento se detuvo el crecimiento poniendo el matraz en hielo y el cultivo se centrifugó en una centrífuga Beckman J-1 a 4 °C a 4000 rpm. Las células precipitadas se resuspendieron en un volumen de 10 mL de CaCl<sub>2</sub> (Panreac) 0,1 M frío y se dejaron 30 min en hielo. Se repitió la centrifugación anterior y, en esta ocasión, las células se resuspendieron en 750 µL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M, añadiendo a continuación 750 µL de una disolución de glicerol (Merk)

al 50%. Estas suspensiones se repartieron en tubos Eppendorf de 1,5 mL y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Una vez completada la ligación, ésta se añadió a un vial de células competentes, incubándose la mezcla en hielo durante 30 min. A continuación las células se sometieron a un choque térmico a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 1,5 min e inmediatamente se metieron en hielo durante 1 min, se añadió 1 mL de LB y se cultivaron las células en agitación a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 h. A continuación se centrifugaron, se resuspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de LB y se sembraron en placas de agar. En cada placa se incorporó el antibiótico requerido y en los casos en los que fue necesario se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de una disolución de X-gal a 50 mg/mL y 10  $\mu\text{L}$  del inductor IPTG 0,1 M. Las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 12-18 h para su posterior análisis.

## **5.2. Transformación por electroporación**

Para la obtención de células electrocompetentes se partió de 500 mL de un cultivo bacteriano fresco de *E. coli* en medio LB. Se incubó en agitación a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600}$  de 0,2–0,4. El cultivo se centrifugó a 5.000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las células se lavaron varias veces en agua fría estéril. Posteriormente las células se resuspendieron en glicerol al 10% y se centrifugaron a 5.000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . A continuación las células se resuspendieron en 1 mL de glicerol y se repartieron en tubos Eppendorf de 1,5 mL para almacenarlos a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

La reacción de ligación se añadió a un vial de células competentes y la mezcla se introdujo en una cubeta de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad). La transformación se llevó a cabo en un electroporador *Gene Pulser* (Bio-Rad) bajo los siguientes parámetros: 2,5 kv de voltaje, una resistencia de 200  $\Omega$ , y 25  $\mu\text{F}$  de capacitancia en un pulso de 5 ms de duración. Posteriormente la cubeta se lavó con 1 mL de medio LB y se pasó a un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se mantuvo en agitación a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 h. Posteriormente las células se centrifugaron, se resuspendieron en LB y se sembraron en las placas correspondientes.

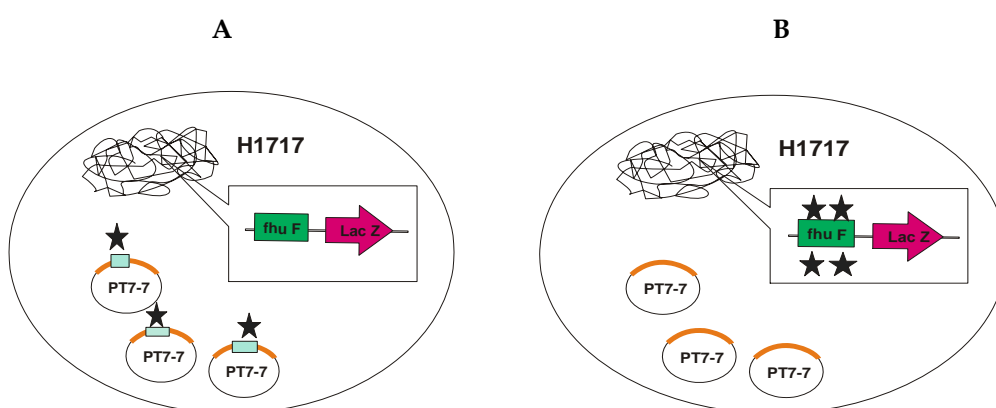
## 6. Secuenciación de DNA y herramientas de bioinformática

El método de secuenciación de DNA empleado en el presente trabajo fue el de terminación de cadena o dideoxi de Sanger, utilizando para ello el kit comercial *GenomeLab DTCS quick start kit* y el secuenciador CEQ 8000 DNA (Beckman Coulter). Tanto las reacciones de secuenciación como la limpieza de las mismas se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Los moldes utilizados en las reacciones fueron plásmidos, cósmidos o productos de PCR. En este último caso para eliminar los restos de cebadores, nucleótidos y sales, los productos de amplificación se purificaron con el *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) o con el *QIAquick gel extraction kit* (Qiagen) si se purificaban bandas recortadas de geles de agarosa.

Para el análisis de las secuencias obtenidas, mapas de restricción y detección de posibles genes (ORFs) se emplearon los programas *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999) y Vector NTI versión 10.3.0 (Invitrogen). La obtención de las secuencias de ADN de los cósmidos se llevó a cabo utilizando un secuenciador 454 GS-FLX (Roche), y el ensamblaje de las secuencias se realizó a partir del software Newbler (Roche). La anotación del plásmido pPHDD1 se realizó mediante el servidor RAST (Aziz *et al.*, 2008) y la generación del mapa gráfico se obtuvo a partir del servidor CGView Server (Grant & Stothard, 2008). El análisis del contenido GC se obtuvo con el programa informático Artemis (Carver *et al.*, 2005). Para el análisis de homologías, tanto de secuencia de nucleótidos como de aminoácidos, se utilizaron los algoritmos FASTA3 y BLAST de las bases de datos EMBL y NCBI respectivamente. Para el análisis de dominios proteicos conservados se consultó la base de datos PFam del Instituto Sanger (*Protein families database of alignments and HMMs* (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)) (Bateman *et al.*, 2004). La aplicación *Virtual Footprint Promoter Matches* de la base de datos PRODORIC Release 8.1 (<http://prodoric.tu-bs.de/>) se utilizó para identificar posibles regiones operadoras.

## 7. Ensayo de titulación de Fur (FURTA)

Se utilizó este método para identificar genes cuya expresión está regulada por hierro (Stojiljkovic *et al.*, 1994). Se basa en el uso de la cepa indicadora de *E. coli* H1717 (Hantke, 1987), que tiene insertada en su cromosoma una fusión transcripcional del gen *lacZ* con el promotor del gen *fhuF*. Esta fusión es muy sensible a los cambios en los niveles del represor Fur, el cual reprime la expresión de los genes cuyo promotor contiene “cajas Fur”. Así, cambios en los niveles de la proteína Fur, (provocados por la introducción de promotores regulados por esta proteína) se van a manifestar fenotípicamente por la expresión del gen *lacZ*, y la consiguiente aparición de colonias de coloración rojiza que fermentan la lactosa (Figura III.4).



**Figura III.4:** (A) Plásmidos con cajas Fur que permiten la expresión del gen *lacZ*, dan lugar a colonias rojas. (B) Plásmidos sin cajas Fur, el gen *lacZ* no se expresa y dan lugar a colonias blancas.

A partir de digestiones parciales del ADN genómico de las cepas P3335 de la subsp. *piscicida* y RM-71 de la subsp. *damselae* con el enzima de restricción *Sau3AI*, y posterior ligación en el plásmido pT7-7, se obtuvieron genotecas con fragmentos de ADN entre 1 y 3 kb. Las genotecas se electroporaron en la cepa indicadora de *E. coli* H1717 y se sembraron en medio MacConkey Agar Base (Difco) suplementado con 1% lactosa, 0,04 mM  $\text{FeSO}_4$ , kanamicina y ampicilina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se aislaron aquellas colonias que después de incubarse 24 h a 37 °C presentaban un fenotipo rojo (*lac*+), indicando que el fragmento clonado contenía regiones que secuestran la proteína Fur de *E. coli* (Stojiljkovic *et al.*, 1994). Se purificó el ADN plasmídico y se cortó con *EcoRI* y *HindIII* para diferenciar patrones repetidos y descartarlos. Los plásmidos no

descartados se secuenciaron para obtener las secuencias de los posibles genes regulados por hierro.

## **8. Obtención de mutantes espontáneos resistentes a rifampicina**

Debido a la ausencia de resistencias estables en las dos cepas principales utilizadas en este trabajo, y para poder realizar mutagénesis por intercambio alélico, era necesario contar con algún fenotipo específico, que nos permitiese seleccionar dichas cepas. Para ello, se procedió a la obtención de un mutante espontáneo de resistencia al antibiótico rifampicina. Para el aislamiento del mutante se utilizó la técnica de gradiente en placa utilizando un gradiente de rifampicina de 0 a 100 µg/mL. Las cepas se cultivaron durante 18 h a 25 °C en 5 mL de medio TSC-1 con agitación hasta que se alcanzó la fase logarítmica, se sembraron alícuotas de 0,1 mL en las placas con gradiente de rifampicina, y se incubaron durante 36 h a 25 °C. Las colonias obtenidas se sembraron en una nueva placa con gradiente para estimar el grado de resistencia al antibiótico, y se incubaron de nuevo a 25 °C durante 36 h.

## **9. Mutagénesis**

### **9.1. Obtención de mutantes por intercambio alélico**

Esta técnica permite intercambiar la copia nativa de un gen por una que contiene una delección de la región central del gen a estudiar. Se amplificaron por PCR los extremos 5' y 3' de cada gen junto con las regiones flanqueantes utilizando el *KAPA High Fi PCR kit* (KAPA BIOSYSTEMS), con un tamaño de aproximadamente 2 kb, de tal manera que al pegar cada extremo obtengamos una mutación no polar por delección de gran parte de la secuencia codificadora del gen. A cada uno de los cebadores utilizados en la reacción de amplificación se le añadió a modo de adaptador la secuencia diana de una enzima de restricción que garantizará la correcta orientación de los fragmentos. Los adaptadores 2 y 3 contienen igual diana de restricción, esto garantiza que la construcción se realiza en la orientación adecuada. Los cebadores empleados a lo largo de este trabajo en la construcción de los mutantes se muestran

en la Tabla III.3. Ambos fragmentos (región 3' y 5' de cada gen) se clonaron en el plásmido pWKS30 de modo secuencial utilizando la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ . La construcción se liberó del pWKS30 con *NotI*-*ApaI* y se ligó al vector suicida pNidkan (Mouriño *et al.*, 2004) o pNidia (según el marcador de resistencia necesario fuese Kan o Amp, respectivamente) linearizados con las mismas enzimas. Ambos vectores suicidas, como derivados del pCVD442, contienen el origen de replicación R6K que requiere el gen *pir* (por lo cual se mantienen en la cepa de *E. coli* S17-1- $\lambda$ *pir*) y el gen *sacB* que confiere sensibilidad a la sacarosa. La construcción se conjugó desde *E. coli* S17-1- $\lambda$ *pir* a *P. damsela*. Dicha conjugación se realizó a partir de 100  $\mu$ L obtenidos de centrifugar 1 mL de las cepas donadora y receptora previamente ajustadas a una DO<sub>600</sub> de 1. Dicha mezcla se dispuso en una placa de agar sangre y se dejó conjugando durante 3-4 días a 25 °C. Tras la conjugación se seleccionaron en placas de TSA-1 con los antibióticos pertinentes las colonias de *P. damsela* en las que la construcción se había integrado en su genoma por recombinación homóloga. La característica primordial del plásmido utilizado es su incapacidad de replicarse en *P. damsela* al carecer éste del gen  $\lambda$ *pir*, de modo que únicamente se perpetuará cuando se integre en el genoma bacteriano por un proceso de recombinación entre secuencias homólogas.

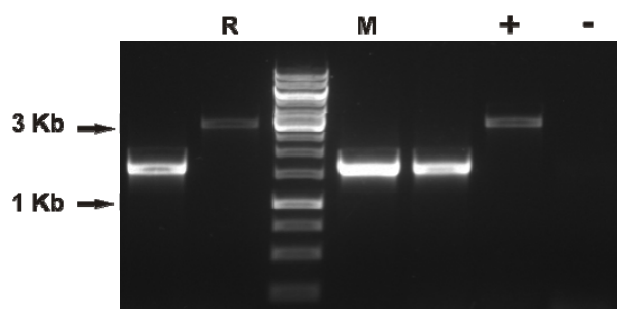
Tabla III.3: Cebadores utilizados en la construcción de mutantes.

Cebador	Secuencia (5' → 3') <sup>a</sup>	aac prot./ aac delc-
<b>gen de la O-metiltransferasa</b>		
c26 P3335 mut1	gcgggcccgaagctgcaatttgctgacg	266/224
c26 P3335 mut2	gcctgcagatcatcagctaagctctcca	
c26 P3335 mut3	gcctgcagcttaagtatcgctcactcc	
c26 P3335 mut4	gcggatcctccataaaaagcgaaaataa	
<b>fhuE</b>		
FhuE mut1	gcggatccataattgaccaaccactcc	692/544
FhuE mut2	gcctgcaggtgtttggtctactataac	
FhuE mut3	gcctgcagccgtaatcacgtcccgtaac	
FhuE mut4	gcgaattctgaccccgacaagatagccg	
<b>hlyA<sup>pl</sup></b>		
HlyA mut 1	gcgaattcaaaattagacaagtcaaagg	603/455
HlyA mut 2	gcggatccttgaagctaactcaaaaa	
HlyA mut 3	gcggatcctttttcttcatcactatc	
HlyA mut 4	gctctagacaccgtaacgcgacaatg	
<b>dly</b>		
Dly mut 1	gcctcgagatacttcaacattaatgccg	573/462
Dly mut 2	gcggatccacctccccatttgtgtaa	
Dly mut 3	gcggatcctaccctaatttattcttt	
Dly mut 4	gctctagatttcacttatttatcaagtt	
<b>Doble mutante dly-hlyA<sup>pl</sup></b>		
Dly mut 1	gcctcgagatacttcaacattaatgccg	
Dly mut 2	gcggatccacctccccatttgtgtaa	
HlyA mut 3	gcggatcctttttcttcatcactatc	
HlyA mut 4	gctctagacaccgtaacgcgacaatg	
<b>hlyA<sup>cr</sup></b>		
HlyA cr mut 1	gctctagactccatttgtgaaattagtgccc	603/525
HlyAcr mut 2	gcctgcaggaactccggtaaatttacag	
HlyAcr mut 3	gcctgcagtcacatcagctatagcgct	
HlyAcr mut 4	gcctcgaggattgtttcggtacgcttgg	
HlyA cr mut inser 1	gcctcgagatagttgtatacttttaggt	
HlyA cr mut inser 2	gcctcgagtaatatcacattcagccgtc	
<b>hlyIII</b>		
Hly III mut 1	atttcaccgcttggggcccactgccaa	220/188
Hly III mut 2	gcctcgagcaatttgccattttgtgcc	
Hly III mut 3	gcctcgagtatccagccgcaagttgggg	
Hly III mut 4	gcggatcctctggtagaccaaacacacc	

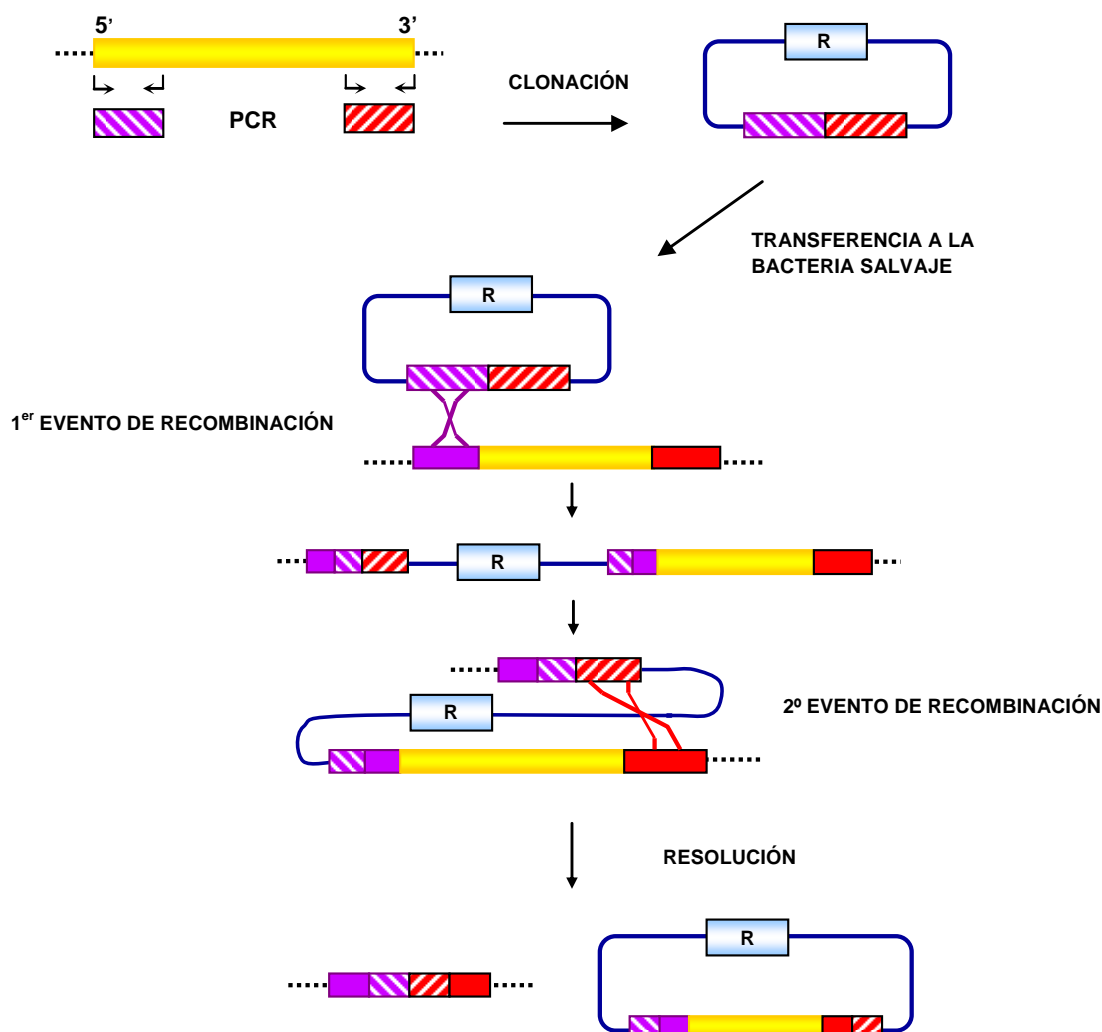
<sup>a</sup> La secuencia subrayada marca las dianas de restricción incluidas en el cebador



Se necesita un segundo evento de recombinación para que se libere el plásmido suicida, y con ello arrastre la copia completa del gen, dejando en su lugar la copia delecionada. Una vez integrada la construcción en el cromosoma, en el 50% de los casos la segunda recombinación sucederá en la misma región, y en estos casos se libera el plásmido suicida junto con la copia delecionada. Pero en el otro 50% de los casos la recombinación se producirá en el otro fragmento, con lo que el plásmido arrastrará la copia intacta de gen, dejando la copia delecionada en el cromosoma. Tras realizar unos 5-7 pases en TSC-1, sin presión selectiva para la resistencia del plásmido suicida, se plaquean diluciones en LB con 10% sacarosa para la subsp. *piscicida* y 15% para la subsp. *damselfae*. Las células capaces de formar colonias son aquellas que han perdido el plásmido suicida y con ello el gen *sacB*. Se comprueba por PCR qué colonia es revertiente y cuál es mutante. Habitualmente se utilizan los cebadores que amplifiquen aproximadamente la zona delecionada, con lo que los mutantes producirán productos de PCR de aproximadamente 1 Kb mientras que los revertientes mostrarán tamaños tan grandes como las zonas nativas del gen (Figura III.5). El mecanismo de obtención de mutantes por intercambio alélico se esquematiza en la Figura III.6.



**Figura III.5:** Comprobación de mutantes por intercambio alélico mediante amplificación por PCR de la zona delecionada: (R) revertiente, (M) mutante, (+) control positivo (genómico), (-) control negativo.



**Figura III.6:** Esquema del proceso de mutación por intercambio alélico: El alelo mutante se obtiene amplificando las regiones 5' y 3' del gen, y uniendo ambos fragmentos en un mismo plásmido que facilitará la transferencia de la copia delecionada a la bacteria. Tras un primer evento de recombinación, el plásmido se inserta en el cromosoma bacteriano. Las colonias recombinantes son seleccionadas en base al marcador de resistencia a antibiótico del plásmido (R). Tras sucesivos ciclos de división se selecciona una segunda recombinación en la que en un 50% de los casos, el plásmido se libera del cromosoma y arrastra consigo la copia salvaje del gen. Una vez libre en el citoplasma, el vector se perderá en el momento de la división celular ya que, debido a su origen de replicación R6K, es incapaz de autoreplicarse en la bacteria. El resultado final de todo el proceso es la sustitución cromosómica del gen por su copia delecionada.



cuantitativamente a la cepa salvaje ya que el gen introducido está en un número de copia diferente al resto de genes del sistema nativo. Los genes complementados y los cebadores utilizados se muestran en la Tabla III.4.

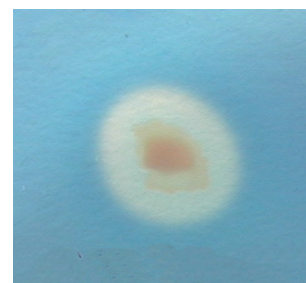
**Tabla III.4:** Cebadores utilizados en la clonación de los genes complementados.

Gen	Cebador	Secuencia (5' → 3') <sup>a</sup>
<i>hlyA<sup>pl</sup></i>	<i>hlyA<sup>pl</sup></i> gen 3'	gcggatccgctataaatgaataagaaaa
	<i>hlyA<sup>pl</sup></i> gen 5'	gcggatccctgggtgcggaaaatgttggt
<i>dly</i>	<i>dly</i> gen 3'	gcggatcccttaacaggattgttgaattt
	<i>dly</i> gen 5'	gcggatccattccaattattattttgta
<i>hlyA<sup>cr</sup></i>	Orf <i>hlyA<sup>cr</sup></i> 3'	gcggatccgattccagctcaacgctaga
	Orf <i>hlyA<sup>cr</sup></i> 5'	gctctagacggcttttgcatttctgcg

<sup>a</sup> La secuencia subrayada marca las dianas de restricción incluidas en el cebador

## 11. Ensayos de crecimiento en limitación de hierro

Para determinar la capacidad de crecimiento de los mutantes por delección, se realizaron ensayos de crecimiento en condiciones restrictivas de hierro. A partir de una colonia, se inocularon 5 mL de LB líquido que se dejó crecer en agitación a 25 °C durante 12 h. Los cultivos se ajustaron a una DO<sub>600</sub> de 1 y se diluyeron 1:100 en medio mínimo CM9 (Lemos *et al.*, 1988) con diferentes concentraciones del agente quelante de hierro 2,2'-dipiridil (Sigma) o ácido etilen-diamino-di-(*o*-hidroxifenilacético) (EDDA) en los ensayos llevados a cabo con las cepas de *V. anguillarum*. Los cultivos se incubaron a 25 °C en agitación y al cabo de 12 h se observó el crecimiento mediante la medición de la DO<sub>600</sub>. Como control positivo se analizaron los mismos parámetros sobre cultivos con 10 µM de Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> (condiciones de disponibilidad de hierro). Para cuantificar la producción de sideróforos se utilizó la prueba del cromo azurol-S (CAS) (Schwyn & Neilands, 1987) en sobrenadante y placas



**Figura III.8:** Detección de la producción de sideróforos en placas de CAS agar.

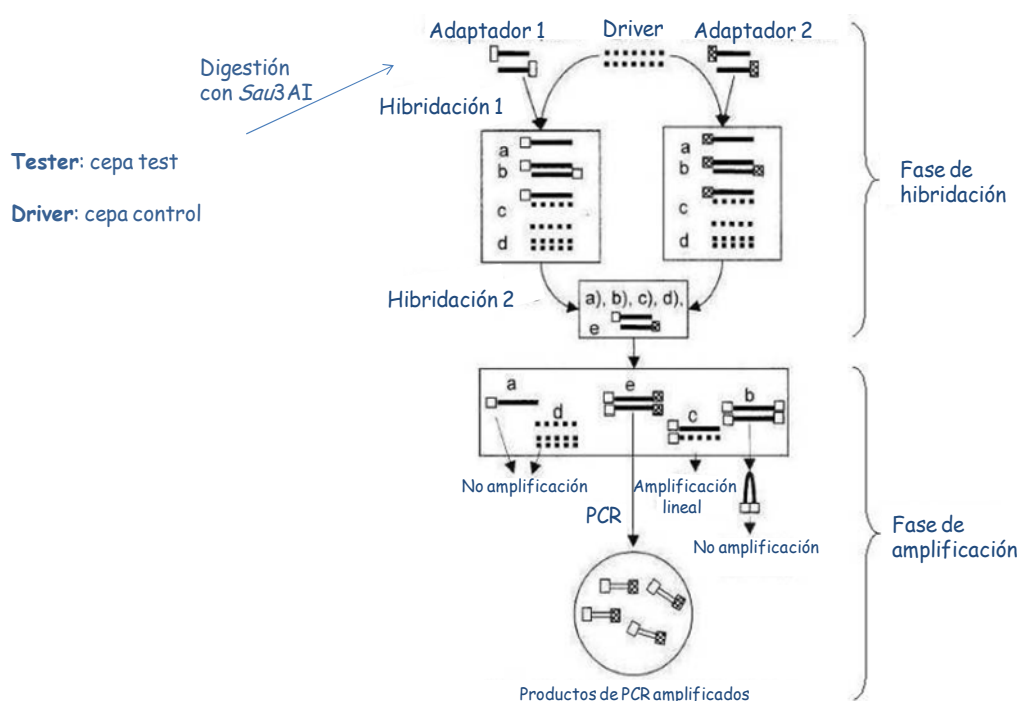
de agar CAS. Esta prueba detecta la presencia de sustancias con actividad quelante de hierro utilizando un complejo ferri-cromogénico que cambia de color cuando pierde los iones  $\text{Fe}^{+3}$ . Los sideróforos, que tienen más afinidad por el  $\text{Fe}^{+3}$  que el cromógeno, pueden capturar el  $\text{Fe}^{+3}$  del complejo ferri-cromógeno, resultando en un cambio del color del colorante de azul a amarillo-anaranjado. Para realizar la prueba de CAS sobrenadante se mezclaron volúmenes iguales (0,5 mL) de sobrenadante del cultivo correspondiente y reactivo de CAS (Schwyn & Neilands, 1987). Al cabo de 15 min, se midió la  $A_{630}$  en un espectrofotómetro. Valores de absorbancia más negativos indican mayor concentración de sideróforo en el sobrenadante. Las placas de agar CAS presentan una coloración azulada, que debido al complejo ternario que el CAS y HDTMA (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) forman con el  $\text{Fe}^{+3}$ , cambia a anaranjada cuando un agente quelante de hierro o un sideróforo le sustrae este catión (Figura III.8). La lectura se efectuó a las 24-48 horas, detectándose la producción de sideróforos por la formación de un halo anaranjado sobre el fondo azul del medio.

## 12. Hibridación sustractiva (SSH)

Los experimentos de sustracción del genoma bacteriano se realizaron siguiendo las indicaciones de los sistemas *PCR-Select Bacterial Genome Subtraction Kit* y *Advantage cDNA Polimerase Kit* (Clontech). Se denominó “cepa test” o “tester” a aquella de cuyo genoma queríamos seleccionar fragmentos específicos y “cepa control” o “driver” a aquella cuyo genoma se enfrentó al de la cepa test. Se llevaron a cabo dos hibridaciones sustractivas. En el primer experimento (SSH I) se empleó como cepa test la cepa P3335 de *P. damsela* subsp. *piscicida* y como control la cepa RM-71 de *P. damsela* subsp. *damsela*, mientras que en el segundo experimento (SSH II) se invirtió el orden de las cepas siendo la cepa test la cepa RM-71 de *P. damsela* subsp. *damsela* y la cepa control la cepa P3335 de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Brevemente, en cada experimento se extrajo el ADN genómico de ambas cepas y se digirieron 2-3  $\mu\text{g}$  de cada uno con la enzima de restricción *RsaI* entre 20 y 30 min a 37 °C. A continuación el ADN de la cepa test se dividió en dos tubos y a cada uno se le añadió uno de los dos adaptadores incluidos en el kit. A continuación se realizaron dos hibridaciones consecutivas. En la primera hibridación se añadió a los tubos que

contenían el ADN de la cepa test, con su respectivo adaptador, un exceso de ADN de la cepa control para posteriormente desnaturalizar las muestras por calor y permitir que hibridaran entre sí. En la segunda hibridación, las muestras provenientes de la primera hibridación se mezclaron, y, sin desnaturalizarlas previamente por calor, se permitió que hibridaran entre sí. La mezcla resultante de esta segunda hibridación se empleó como ADN molde en dos reacciones consecutivas de PCR con el objetivo de amplificar secuencias específicas del genoma de la cepa test (Figura III.9).

**Figura III.9:** Resumen esquemático del ensayo de hibridación sustractiva (SSH). El ensayo consta de una fase de hibridación con dos hibridaciones consecutivas y una fase de amplificación, con una PCR anidada.



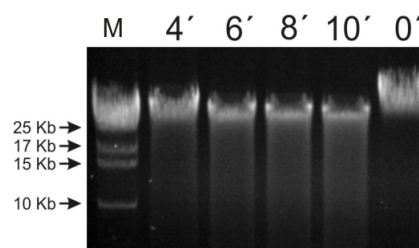
Los fragmentos obtenidos se clonaron en el vector pGEM-T del kit *pGEM-T-Easy Vector System* (Promega). Los productos de clonación se transformaron por electroporación en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Las colonias se seleccionaron a partir de placas de LB con ampicilina (50  $\mu$ g/mL), IPTG (0,5 mM) y X-gal (40  $\mu$ g/mL). Las colonias de coloración blanca se reislaron y se analizaron mediante PCR utilizando los cebadores universales M13. Se purificó el plásmido y se procedió a su secuenciación.

### 13. Hibridación ADN-ADN mediante Dot Blot

Con el fin de identificar aquellos clones que contuviesen secuencias específicas de la cepa test en los experimentos de hibridación sustractiva se realizaron hibridaciones de tipo Dot Blot. Para ello el ADN plasmídico de cada clon seleccionado se aisló y 200 ng del mismo se desnaturalizaron a 100 °C durante 10 min. Inmediatamente después el ADN se transfirió por duplicado a dos membranas de nylon *Amersham Hybond-N* (GE Healthcare Limited) utilizando un sistema Minifold II (Schleicher & Schuell). El ADN transferido se fijó a la membrana con luz ultravioleta durante 2 min en un *UV-crosslinker* (Linus). Cada una de las membranas se sometió a hibridación con una de las dos sondas constituidas por 2 µg de ADN genómico de las cepas test y control, previamente digeridos con la enzima de restricción *RsaI* durante 20 min a 37 °C. Los tratamientos a los que se sometió la membrana y el marcaje de la sonda se llevaron a cabo siguiendo las especificaciones del sistema *ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System* (Amersham Biosciences). Previamente a la incorporación de la sonda, la membrana de nylon se incubó durante 1 h a 42 °C en un horno rotatorio con el tampón de hibridación (*ECL Gold Hybridization Buffer*, Amersham Biosciences) para bloquear posibles uniones inespecíficas de la sonda. Tras la adición de la sonda marcada (10 ng/mL), se continuó la incubación durante 12 h a 42 °C. Para la detección de la hibridación se utilizaron diferentes tiempos de exposición de las membranas empleando un lector de luminiscencia *LAS 3000* (Fujifilm).

### 14. Obtención de una genoteca de cósmidos de la cepa RM-71

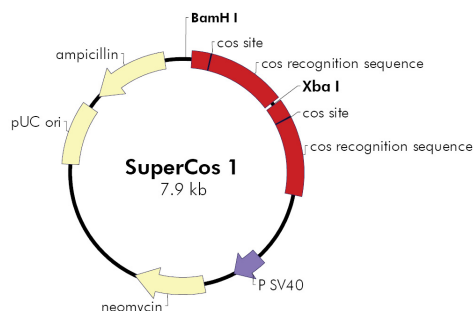
Para la obtención de la genoteca de cósmidos se partió de una extracción de ADN genómico de la cepa RM-71 realizado con el kit *G\_NOME®DNA KIT* (QBIOgene) siguiendo las indicaciones del fabricante, lo que asegura que el ADN de partida no esté fragmentado. Posteriormente se realizó una digestión parcial de 5 µg de ADN con 0,1 U de *Sau3AI* en un volumen total de 100 µL. Tras 4 min de digestión se paró la reacción con 15 µL de EDTA



**Figura III.10:** ADN genómico de la cepa RM-71 digerido con *Sau3AI*. Los números indican el tiempo de digestión, (M) Marcador fago λ.

0,5 M. Con este protocolo de digestión se obtuvieron fragmentos de ADN de tamaños superiores a 25 kb. Finalmente, la muestra de ADN parcialmente digerido se trató con fosfatasa alcalina (Fermentas) (Figura III.10).

El vector de clonación utilizado para la obtención de la genoteca de cósmidos, fue el *SuperCos1 Cosmid Vector Kit* (Stratagene) (Figura III.11). El vector se cortó con la enzima de restricción *XbaI*, se defosforiló y finalmente se digirió con *BamHI* tal y como se indica en el manual del fabricante. Tras cada reacción enzimática se limpió con fenol-cloroformo-isoamilalcohol (25:24:2). Por último, se realizó una reacción de ligación que contenía 2,5 µg de ADN genómico y 1 µg de *SuperCos1*. Para el encapsulado de los bacteriófagos e infección se utilizó, según el protocolo, el kit *Gigapack III packaging Extract* (Stratagene) y la cepa de *E. coli* XL1-blue MR (Stratagene). Como resultado final, se obtuvieron 316 colonias que fueron utilizadas para rastrear la presencia de determinados genes mediante PCR. Con esta metodología se identificaron 5 cósmidos que contenían la mayor parte de la secuencia del plásmido pPHDD1.



**Figura III.11:** Esquema del vector utilizado para la construcción de la genoteca de cósmidos de la cepa RM-71.

## 15. Ensayo de actividad hemolítica

Para la medición de la actividad hemolítica de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* se siguieron dos métodos, uno cualitativo basado en los tamaños de los halos hemolíticos en placas de agar sangre, y otro cuantitativo basado en la medición espectrofotométrica de la cantidad de hemoglobina liberada en una suspensión de eritrocitos.

### 15.1 Medición de la actividad hemolítica en placas de agar sangre

Las placas de agar sangre se elaboraron añadiendo asépticamente sangre humana, de rata, ratón o rodaballo al medio de cultivo TSA-1 hasta alcanzar una concentración final del 5% (v/v). Las placas de agar con sangre de oveja fueron



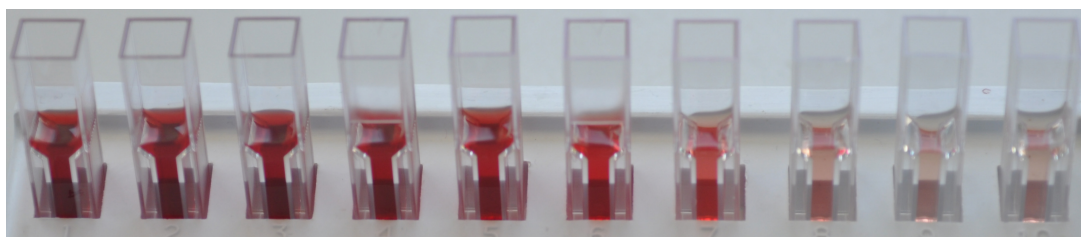
adquiridas comercialmente (Columbia agar, Oxoid). Para determinar la actividad hemolítica por este método, se sembró una colonia de cada cepa en cuestión con la base de un palillo de madera en una placa de agar sangre. La placa se incubó de 12 a 18 h a 25 °C y/o 37 °C según el tipo de sangre utilizada y se midió el halo de hemólisis producido. Definimos el tamaño del halo de hemólisis como la distancia entre el borde externo de la zona de crecimiento bacteriano y el extremo de la zona hemolizada.

## **15.2 Medición de la actividad hemolítica a partir de productos extracelulares**

Para la realización de este ensayo se obtuvieron previamente los productos extracelulares mediante la técnica de membranas de celofán sobre placa descrita por Liu (Liu, 1957). Para ello se depositaron membranas de celofán estériles sobre placas de cultivo de medio TSA-1 y se extendió sobre ellas 1 mL de un cultivo de *P. damselae* subsp. *damselae* ajustado a una DO<sub>600</sub> de 1. Tras un período de incubación de 48 h a 25 °C, se recogieron las células bacterianas mediante lavado de la membrana con solución salina y, tras ajustar las suspensiones obtenidas a una DO<sub>600</sub> de 1, se centrifugaron y los sobrenadantes obtenidos se esterilizaron mediante filtración con membranas de 0,22 µm (Millipore). Los productos extracelulares así obtenidos se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su uso.

Los ensayos de actividad hemolítica se realizaron con eritrocitos de oveja (Oxoid). Los eritrocitos se lavaron varias veces con PBS (pH 7,4) mediante centrifugación (3.000 rpm/5 min/4 °C) para obtener una suspensión de eritrocitos libre de hemoglobina. A partir de esta suspensión se determinó la mínima cantidad de eritrocitos necesaria para alcanzar el máximo valor de absorbancia a 540 nm al añadir agua estéril a la suspensión. Dicho valor fue establecido en 200 µL por tubo de muestra analizado. Se realizaron diluciones seriadas de los diferentes productos extracelulares y se mezclaron 500 µL de cada dilución con 500 µL de sangre. Los 500 µL de sangre se obtuvieron al enrasar hasta 500 µL con PBS los 200 µL de la suspensión lavada de eritrocitos. Una vez mezclados se incubaron 2 h a 25 °C en baño de agua y se centrifugaron a 3000 rpm/5 min/4 °C. Como control negativo se utilizaron 500 µL de PBS y como control positivo 500 µL de agua destilada. Para determinar el grado de lisis

de los eritrocitos, y por consiguiente la cantidad de hemoglobina liberada, se midió en un espectrofotómetro la absorbancia a 540 nm de los sobrenadantes obtenidos de la centrifugación (Figura III.12). Una unidad hemolítica (HU) se define como la cantidad de hemolisina que causa la lisis del 50% de los eritrocitos. El valor correspondiente a la actividad hemolítica se calculó por tanto a partir de la inversa de la dilución que provocaba la lisis del 50% de eritrocitos.

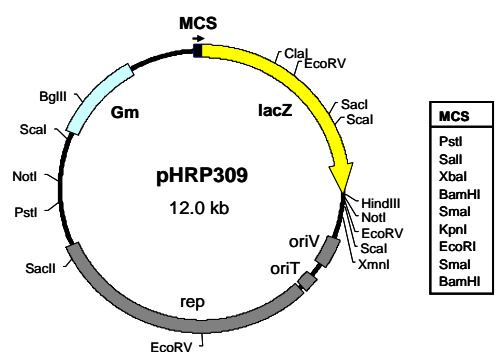


**Figura III.12:** Muestras preparadas para la medición espectrofotométrica de la cantidad de hemoglobina liberada en los ensayos de hemólisis en líquido con productos extracelulares de *P. damsela* subsp. *damsela*. Nótese la disminución de hemoglobina liberada al aumentar la dilución (de izquierda a derecha).

## 16. Fusiones transcripcionales y ensayos de actividad $\beta$ -galactosidasa

El plásmido de bajo número de copia pHRP309 (Parales & Harwood, 1993), específico para la construcción de fusiones transcripcionales, se caracteriza por incluir el gen *lacZ* sin un promotor que regule su expresión (Fig. III.13). La clonación de una secuencia con actividad promotora dentro de la región localizada anteriormente a este gen implica que su

transcripción y síntesis quede bajo el control del inserto clonado. Se amplificaron por PCR, utilizando *KAPA High Fi PCR kit* (KAPA BIOSYSTEMS), las regiones susceptibles de constituir los promotores de los genes *dly*, *hlyA<sup>pl</sup>*, *hlyA<sup>cr</sup>* y de la O-metiltransferasa. Los fragmentos amplificados tenían un tamaño que osciló entre 700 y 1300 pb e incluían 50-100 pb posteriores al codón de iniciación de la traducción. Los cebadores utilizados



**Figura III.13:** Mapa del plásmido pHRP309 específico para el ensayo de fusiones transcripcionales. MCS, zona de clonación.

contenían dianas de restricción que actúan a modo de adaptadores, lo que permitió clonar los fragmentos en el plásmido pHRP309 en la orientación apropiada (Tabla III.5). Los plásmidos obtenidos constituyeron las siguientes fusiones: gen O-metiltransferasa::*lacZ* (pAJR4), *dly*::*lacZ* (pAJR51), *hlyA<sup>pl</sup>*::*lacZ* (pAJR53), *hlyA<sup>cr</sup>*::*lacZ* (pAJR45), que se movilaron desde la cepa S17-1- $\lambda$ pir de *E. coli* a la cepas 775 y 775met11 (*fur*<sup>-</sup>) de *V. anguillarum* (en el caso de pAJR4) y a la cepa RM-71 de *P. damselae* subsp. *damselae* (en los demás casos). Los transconjugantes se seleccionaron de acuerdo con su resistencia a los antibióticos gentamicina (marcador del pHRP309) y rifampicina. Como control negativo se utilizaron las mismas cepas conteniendo el vector pHRP309 sin inserto.

**Tabla III.5:** Cebadores utilizados en la clonación de las regiones promotoras.

Cebador	Secuencia (5' → 3') <sup>a</sup>	Tamaño amplificado
<b>Promotor gen O-metiltransferasa</b>		
IN P3335 C-26 <i>Xba</i> I	<u>gctctaga</u> aattcaggaatgccaccaac	806
IN P3335 C-26 <i>Bam</i> HI	gc <u>ggatcc</u> aggatcgtaaatgagccca	
<b>Promotor <i>dly</i></b>		
Prom Dly 5' <i>Xba</i> I	<u>gctctagata</u> acgccctaaattgtgcgc	880
Dly mut 2 <i>Bam</i> HI	gc <u>ggatcc</u> acctccccattgtgtaaa	
<b>Promotor <i>hlyA</i><sup>pl</sup></b>		
Prom HlyA1 mut 4 <i>Xba</i> I	<u>gctctagac</u> accgtaacgcgacaatg	1385
Prom HlyA Plasm. <i>Bam</i> HI	gc <u>ggatcc</u> aggctactaagacctaataa	
<b>Promotor <i>hlyA</i><sup>cr</sup></b>		
HlyA cr prom <i>Xba</i> I	<u>gctctagag</u> taatgggagtccttcatca	1317
HlyA cr prom <i>Bam</i> HI	gc <u>ggatcc</u> cttggcagataagctactaa	

<sup>a</sup> La secuencia subrayada marca las dianas de restricción incluidas en el cebador

Cada una de las cepas de *V. anguillarum* portadoras de la fusión transcripcional del gen de la O-metiltransferasa::*lacZ* (pAJR4) se crecieron en CM9 en condiciones tanto de disponibilidad como de déficit de hierro. Cada una de las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* portadoras de las fusiones transcripcionales *dly*::*lacZ* (pAJR51), *hlyA<sup>pl</sup>*::*lacZ* (pAJR53), y *hlyA<sup>cr</sup>*::*lacZ* (pAJR45), se crecieron en LB con gentamicina también tanto en condiciones de disponibilidad como de déficit de hierro, así como en tres concentraciones crecientes de NaCl. Estas construcciones también se evaluaron en cepas mutantes para las tres hemolisinas con el fin de estudiar la existencia de posibles efectos regulatorios en sus promotores, derivados de la

presencia o ausencia de los productos de sus genes. Cuando estos cultivos alcanzaron la densidad óptica deseada, se procedió a medir la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa se determinaron siguiendo el método de Miller (Miller, 1992).

Para los ensayos con las cepas de *V. anguillarum*, y el promotor del gen de la O-metiltransferasa, las células se incubaron en medio líquido CM9 a 25 °C hasta alcanzar una  $DO_{600}$  entre 0,3 y 0,4. De cada cultivo se hicieron dos ensayos con 0,1 y 0,3 mL respectivamente. Para los ensayos con las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* las células se incubaron en medio LB con gentamicina a 25 °C, y se hicieron tres mediciones con 0,1 mL de cultivo, a las 3, 6 y 9 h de incubación. Todos los ensayos se llevaron hasta un volumen final de 1 mL con tampón Z ( $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  60 mM;  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  40 mM; KCl 10 mM;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1 mM;  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mM; pH 7,0). Tras añadir 20  $\mu$ L de cloroformo y 10  $\mu$ L de una disolución de SDS al 0,1%, la mezcla se incubó a 37 °C durante 5 min. La reacción se inició añadiendo 0,2 mL de ONPG (4 mg/mL en tampón Z). Cuando se detectó el cambio de color (a amarillo), la reacción se bloqueó añadiendo 0,5 mL de  $Na_2CO_3$  1 M. Finalmente la actividad promotora se cuantificó en Unidades de  $\beta$ -galactosidasa midiendo la absorbancia a 420 nm y aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades de } \beta\text{-galactosidasa} = A_{420} \times 1000 / T \times V \times DO_{600}$$

$DO_{600}$ : densidad óptica del cultivo medida a 600 nm justo antes del ensayo

$A_{420}$ : absorbancia de la mezcla de reacción a 420 nm

T: tiempo de la reacción (min)

V: volumen del cultivo ensayado (mL)

Los ensayos se repitieron un mínimo de tres veces de manera independiente y las medias de los resultados obtenidos, así como los índices de error derivados del experimento, se calcularon con el programa de análisis de datos Microsoft EXCEL (Microsoft Office).

## 17. Ensayos de virulencia

Para los ensayos de virulencia con las cepas de *P. damsela*, tanto salvajes como mutantes para alguno de los genes estudiados, se utilizaron dos modelos animales: rodaballo como hospedador poiquiloterma tanto para las cepas de la subsp. *piscicida* como de la subsp. *damsela*, y ratón como hospedador homeoterma exclusivamente para las cepas de la subsp. *damsela*.

### 17.1 Ensayos de virulencia en rodaballo

Para realizar los ensayos de virulencia en rodaballo, se utilizaron alevines de entre 10 y 15 g de peso. Previamente al ensayo, los peces se aclimataron durante 24 h al ambiente de ensayo para evitar posibles episodios de estrés. La temperatura del agua se estableció entre 18 y 20 °C. La preparación de los inóculos se realizó a partir de cultivos frescos de 12 h en TSA-1, resuspendiendo las células en solución salina y ajustando las densidades celulares mediante comparación por turbidez con la de los tubos de la escala McFarland. La determinación del número de células inyectadas en el inóculo se determinó mediante la siembra en placas de TSA-1 de diluciones decimales seriadas en solución salina de la suspensión inicial. Se inocularon 0,1 mL intraperitonealmente por pez, empleando 5 peces por cada dosis. Como control negativo se inocularon 5 peces intraperitonealmente con PBS.

Los peces se observaron diariamente a lo largo de 5-7 días. De cada tanque de ensayo donde se observaron mortalidades, se analizaron 2-3 peces, y en todos los casos se obtuvieron cultivos puros de los órganos internos (bazo, hígado y riñón). El grado de virulencia se expresó como porcentaje de mortalidad.

### 17.2 Ensayos de virulencia en ratón

Para realizar los ensayos de virulencia en ratón, se seleccionaron ratones BALB/C de 6-8 semanas (26-30 g de peso). Previamente al ensayo, los ratones se aclimataron durante 24 h al ambiente de ensayo para evitar posibles brotes de estrés. Dos horas antes de la inyección de la suspensión celular, los ratones fueron inoculados a través de la vena caudal con 50 µL de una solución 8 µM de hemoglobina para facilitar la infección bacteriana (Fouz *et al.*, 1994). La preparación del inóculo, cálculo de células inyectadas, recuperación de cultivos celulares, duración del experimento y

cálculo del grado de virulencia fueron similares al procedimiento llevado a cabo en rodaballo. La inoculación de las diferentes dosis se realizó por inyección intravenosa de 0,1 mL de suspensión bacteriana a través de la vena caudal.

## IV. Resultados





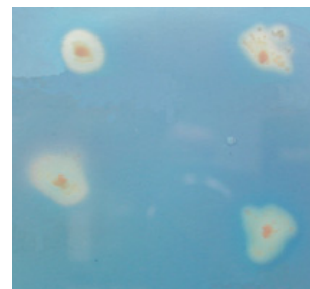
## 1. Búsqueda e identificación de genes implicados en la captación de hierro mediada por sideróforos en *P. damsela*

En trabajos previos se había demostrado que todas las cepas de *P. damsela* independientemente de su origen geográfico producen sideróforos en condiciones de déficit de hierro (Magariños *et al.*, 1994b; Fouz *et al.*, 1997). Las cepas pertenecientes a la subsp. *damsela* producen un sideróforo que pertenece al grupo de los hidroxamatos (Fouz *et al.*, 1997), pero la base genética de la biosíntesis y transporte de dicho hidroxamato es desconocida hasta la fecha. En la subsp. *piscicida* se sabe que no es del tipo catecol ni hidroxamato (Magariños *et al.*, 1994b; Bakopoulos *et al.*, 1997). También se ha demostrado una clara diversidad a nivel genético en estos sistemas de captación de hierro mediante sideróforos (Bakopoulos *et al.*, 1997; Magariños *et al.*, 2000), llegándose a determinar la existencia de dos linajes clonales dentro de *P. damsela* subsp. *piscicida* según su procedencia: uno que incluiría a las cepas de origen europeo y otro que englobaría a las cepas de origen japonés. Recientemente se ha demostrado que la mayoría de las cepas de procedencia europea presentan un sistema de síntesis y captación de un sideróforo de tipo fenolato estructuralmente relacionado con la yersiniabactina. Los genes de este sistema, conocidos como genes *irp* (de *iron regulated protein*) al igual que en *Yersinia enterocolitica*, se encuentran dentro de una isla de patogenicidad (Osorio *et al.*, 2006).

Por ello, una de las primeras líneas de trabajo que nos planteamos fue identificar la base genética de los sistemas de captación de hierro mediada por sideróforos en las cepas de procedencia japonesa y americana en la subsp. *piscicida*, así como en las cepas de la subsp. *damsela*. Para ello, como primera aproximación, llevamos a cabo un ensayo de titulación de Fur (FURTA) como la técnica que pensamos podría ser más adecuada para alcanzar nuestro objetivo.

### 1.1 Pruebas de crecimiento en condiciones de limitación de hierro

Antes de realizar los ensayos de titulación de Fur, comprobamos la producción de sideróforos en una colección de cepas de la subsp. *piscicida* que carecían de los genes de síntesis de sideróforos descritos en las cepas de procedencia europea (genes *irp*) (Tabla IV.1) mediante ensayos con el colorante CAS, tanto en sobrenadante como en placa. Las cepas se sembraron en agar CAS para poder visualizar la producción de sideróforos a través de la aparición de un halo de color anaranjado. Como se puede observar, el halo producido es similar en todas las



**Figura IV.1:** Producción de sideróforos de cepas de la subsp. *piscicida* en placas de agar CAS. De izquierda. (arriba) a derecha. (abajo): P3335, P3333, DI-21, ATCC 29690.

cepas, independientemente de su origen geográfico (Figura IV.1). Posteriormente se evaluó la producción de sideróforos en medio mínimo CM9 bajo diferentes concentraciones del agente quelante de hierro 2,2'-dipiridil (Tabla IV.1). A las 12 h de cultivo se evaluó el crecimiento por la densidad óptica, y se cuantificó la producción de sideróforos mediante el ensayo de CAS en sobrenadante. Según los resultados obtenidos se optó por elegir la cepa P3335 de *P. damsela* subsp. *piscicida* para realizar un ensayo de titulación de Fur, dado que esta cepa presentaba la mejor relación entre crecimiento y producción de sideróforos en el ensayo CAS.

Siguiendo el mismo criterio de selección que en las cepas de la subsp. *piscicida* y basándonos en trabajos previos sobre la producción de sideróforos en las cepas de la subsp. *damsela* (Fouz *et al.*, 1997), elegimos la cepa RM-71 perteneciente a esta subespecie para la realización de un segundo ensayo de titulación de Fur.

**Tabla IV.1:** Crecimiento durante 12 h en CM9 bajo diferentes concentraciones de 2,2'-dipiridil expresado en valores de densidad óptica a 600 nm (panel superior), y medición de absorbancia en CAS a 630 nm para determinar la producción de sideróforos (panel inferior). Los valores obtenidos en el ensayo de CAS son valores negativos, por lo que cuanto más negativo sea el valor, más cantidad de sideróforos hay en el sobrenadante. En rojo, la cepa seleccionada de la subsp. *piscicida*: P3335.

Cepas	CM9 + 2,2'-Dipiridil				
	Ø	25 µM	50 µM	75 µM	100 µM
DI-21	1,03	1,08	0,94	0,69	0,40
<b>P3335</b>	<b>2</b>	<b>1,76</b>	<b>1,12</b>	<b>0,58</b>	<b>0,63</b>
P3333	1,06	1,01	0,70	0,16	0,05
MZS 8001	1,40	1,03	0,60	0,24	0,10
10831	2	2	0,70	0,33	0,14
MP 7801	2	2	0,50	0,20	0,55
ATCC 29690	2	2	0,98	0,12	0,08
EPOY 8803 II	2,12	2,3	0,57	0,23	0,21

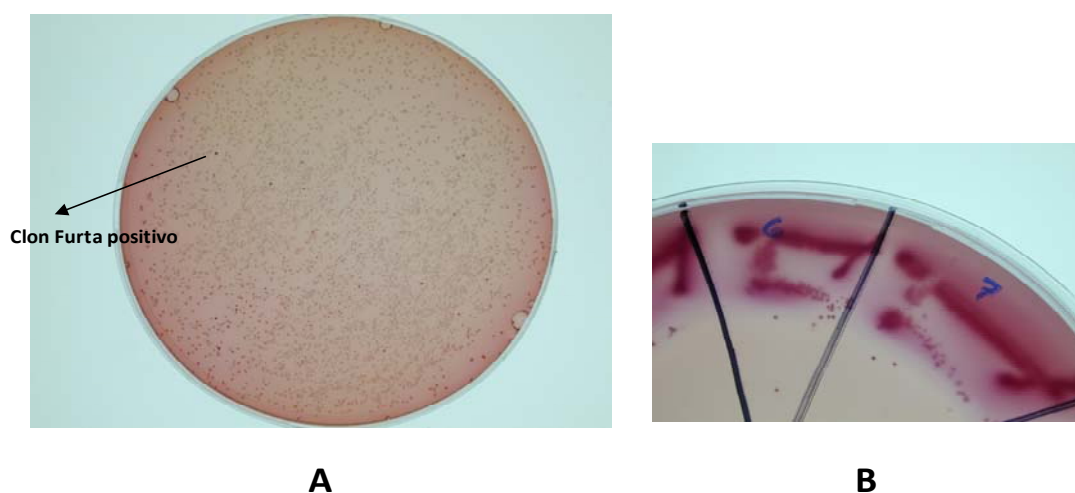
Cepas	Producción en CAS				
	Ø	25 µM	50 µM	75 µM	100 µM
DI-21	-0,14	-0,12	-0,13	-0,30	-0,26
<b>P3335</b>	<b>-0,05</b>	<b>-0,16</b>	<b>-0,16</b>	<b>-0,18</b>	<b>-0,17</b>
P3333	0,06	-0,05	-0,16	-0,15	0,13
MZS 8001	-0,11	-0,17	-0,24	-0,18	-0,20
10831	0,04	-0,07	-0,07	-0,07	-0,08
MP 7801	-0,007	-0,12	-0,05	-0,06	-0,12
ATCC 29690	0,006	-0,11	-0,13	-0,13	-0,13
EPOY 8803 II	0,07	-0,13	-0,08	-0,09	-0,10

## 1.2 Ensayo de titulación de Fur (FURTA)

El ensayo de titulación de Fur se basa en el uso de la cepa indicadora de *E.coli* H1717 (Hantke, 1987), la cual tiene insertada en su cromosoma un promotor regulado por la proteína Fur fusionado con el gen *lacZ* (normalmente se usan promotores como *fiu* o *fhuF*). Si se introduce en dicha cepa una genoteca construida en un vector de alto número de copia y alguno de los plásmidos es portador de un fragmento de DNA que contiene una caja Fur, se producirá una desregulación del sistema y las moléculas de Fur verán desplazado su equilibrio de unión al promotor de *fhuF*, tendiendo a unirse a las cajas Fur del plásmido en alto número de copia. Ello produce la desrepresión de la fusión *fhuF-lacZ*, dando lugar a un incremento de la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa lo que provoca que las colonias aparezcan de color rojo al crecer en agar MacConkey suplementado con lactosa y una fuente de hierro. Las genotecas de las cepas P3335 de

la subsp. *piscicida* y RM-71 de la subsp. *damsela* construidas en el plásmido de alto número de copia pT7-7 se electroporaron a la cepa indicadora *E. coli* H1717. Se seleccionaron aquellas colonias que presentaban un color rojo en medio agar MacConkey y se reaislaron para verificar su fenotipo *lac*<sup>+</sup> (Figura IV.2) y realizar una extracción de ADN plasmídico.

**Figura IV.2:** Colonias resultantes de la electroporación de una genoteca de *P. damsela* subsp. *piscicida* en el plásmido de alto número de copia pT7-7, en células de *E. coli* H1717 (A) y reaislamiento posterior de las colonias *lac*<sup>+</sup> en agar MacConkey (B).



### **1.2.1 Genes regulados por hierro en la subsp. *piscicida***

Los insertos de los clones seleccionados se secuenciaron parcialmente o completamente hasta localizar la caja Fur, gen o secuencia responsable del fenotipo *lac*<sup>+</sup>. La Tabla IV.2 recoge los datos de identidad y similitud entre las proteínas codificadas en los clones obtenidos del ensayo FURTA aplicado a la cepa P3335 de la subsp. *piscicida* y los homólogos más próximos obtenidos tras un análisis comparativo con las secuencias de las bases de datos.

A continuación describimos con más detalle aquellos clones y ORFs que, puesto que codifican proteínas con homólogos ya descritos, nos permiten aportar algo más de información acerca de su posible función biológica.

**Tabla IV.2:** ORFs predichas a partir de los clones FURTA positivos de la cepa P3335 de *P. damsela* subsp. *piscicida*, y sus homólogos más próximos.

ORF	Homólogo	nº acceso	nº aminoácidos	% identidad aminoácidos	% similitud aminoácidos
ORF1 (C-31)	MadN ( <i>P. profundum</i> )	gi:54307345	291	87	92
ORF2 (C-31)	Proteína stress universal UspB ( <i>P. profundum</i> )	gi:54307348	120	76	91
ORF3 (C-31)	Proteína hipotética ( <i>P. profundum</i> )	gi:54307350	395	93	96
ORF4 (C-31)	Ferritina ( <i>P. profundum</i> )	gi:54307347	175	90	94
ORF5 (C-32)	Hipotética kinasa de sistema sensor de dos componentes ( <i>P. profundum</i> )	gi:54302380	463	54	69
ORF6 (C-32)	Precursor del receptor FhuE ( <i>Photobacterium</i> sp.)	gi:89075639	696	85	94
ORF7 (C-34)	Receptor del grupo hemo ( <i>P. profundum</i> )	gi:90410518	715	79	91
ORF8 (C-35)	Transposasa B ( <i>V. vulnificus</i> )	gi:37678743	141	69	83
ORF9 (C-35)	Proteína relacionada con ExbB ( <i>P. profundum</i> )	gi:54302374	455	62	80
ORF10 (C-39)	Tirosil-tRNA sintetasa ( <i>P. profundum</i> )	gi:54307738	395	86	92
ORF11 (C-39)	Proteína hipotética familia DedA ( <i>Photobacterium</i> sp.)	gi:89072504	239	76	88
ORF12 (C-39)	Proteína de membrana ( <i>Photobacterium</i> sp.)	gi:89072505	203	85	93
ORF13 (C-39)	Proteína hipotética ( <i>P. profundum</i> )	gi:54307741	274	61	78
ORF14 (C-39)	Adenosilcobinamida-fosfato sintasa ( <i>Photobacterium</i> sp.)	gi:89072507	319	64	76
ORF15 (C-39)	Transposasa ( <i>V. anguillarum</i> )	gi:38638335	362	43	59
ORF16 (C-50)	Proteína hipotética ( <i>V. angustum</i> )	gi:90581167	88	93	96
ORF17 (C-50)	Proteína relacionada con FixG ( <i>P. profundum</i> )	gi:90413770	476	63	78
ORF18 (C-69)	Proteína A transportadora de iones ferrosos ( <i>P. profundum</i> )	gi:54308251	75	75	88
ORF19 (C-55)	Coproporfirinógeno oxidasa PhuW ( <i>V. parahaemolyticus</i> )	gi:28808593	456	59	75
ORF20 (C-26)	Hipotética O-metiltransferasa ( <i>P. profundum</i> )	gi:54307387	265	66	79

### Genes del operón de captación del grupo hemo

ORF7 y ORF19 codifican el receptor de membrana externa HutA del grupo hemo y la coproporfirinógeno oxidasa PhuW de *P. damsela* subsp. *piscicida*, respectivamente. Estos dos genes han sido descritos anteriormente en nuestro laboratorio y se ha demostrado su regulación por Fur y su papel en la captación del grupo hemo (Río *et al.*, 2005). ORF9 codifica la proteína de membrana integral relacionada con ExbB. Esta familia de proteínas está relacionada con la translocación de diferentes moléculas, como los complejos Fe<sup>+3</sup>-sideróforo a través de la membrana interna (García-Herrero *et al.*, 2007). El gen *exbB* forma parte de un operón que incluye el gen *tonB2* y además está próximo, en el cromosoma de *P. damsela* subsp. *piscicida*, a un pseudogén (gen no funcional) de un receptor de membrana externa para sideróforos (Osorio *et al.*, 2004). En las cepas japonesas este pseudogén está rodeado de genes de transposasas, las cuales están ausentes en las cepas europeas. Esto podría deberse a que las zonas genéticamente redundantes o presuntamente no funcionales, que apenas presentan

presión selectiva (como ocurre en el caso de pseudogenes), son candidatas a presentar inserciones de transposasas.

#### *Genes candidatos de síntesis y transporte de sideróforos*

El promotor de ORF20 presenta una secuencia que comparte 16 de los 19 pares de bases con la caja Fur consenso de *E. coli*. Esta ORF codifica una O-metiltransferasa, proteína que se halla presente en la mayoría de las especies de la familia *Vibrionaceae*, habiendo sido identificado un homólogo en *V. cholerae* mediante un ensayo FURTA (Mey *et al.*, 2005). Existen datos previos de metiltransferasas involucradas en rutas de síntesis de sideróforos: en *Pseudomonas aeruginosa* se ha descrito un homólogo que juega un papel preponderante en la síntesis de pioquelina (Patel & Walsh, 2001). En *Legionella pneumophila* se encontró un operón de dos genes en el que uno de ellos codifica una metiltransferasa (*iraA*) y el otro codifica una proteína involucrada en el transporte de péptidos (*iraB*). Este operón podría estar relacionado en la captación de di o tripéptidos con capacidad de quelar hierro (Viswanathan *et al.*, 2000). Se ha podido demostrar que el gen *iraA* presenta un importante papel en la adquisición intracelular de hierro (Pope *et al.*, 1996; Viswanathan *et al.*, 2000).

ORF6 codifica un homólogo de la proteína de membrana externa FhuE, un receptor dependiente de TonB por el cual se transportan los sideróforos ácido rhodotorúlico, ferrioxamina B y coprógeno férrico (Sauer *et al.*, 1990). Se trata de un típico receptor de xenosideróforos, es decir, le permite captar estos sideróforos en el caso de que se hallen en el medio externo, a especies bacterianas que carecen de genes implicados en la síntesis de los mismos.

#### *Genes de proteínas que unen hierro*

Algunos clones codifican proteínas de unión al hierro, las cuales pueden provocar un fenotipo FURTA-positivo por sí mismas, sin necesidad de que sus promotores contengan secuencias de unión a Fur (Osorio *et al.*, 2004). Esto se debe a que secuestran el hierro intracelular, provocando la desrepresión de la fusión transcripcional *fhuF-lacZ*. En esta categoría se incluyen la ferritina (ORF4) y la ferredoxina (ORF17).

### *Genes de captación del ión $Fe^{+2}$*

La proteína codificada por ORF18 presenta una identidad del 75% con una proteína A de *P. profundum* que forma parte de un sistema involucrado en la captación de la forma ferrosa ( $Fe^{+2}$ ) del hierro. El hierro ferroso es significativamente más soluble que la forma férrica ( $Fe^{+3}$ ) (0,1 M frente a  $10^{-18}$ M), pero su predominancia está restringida a ambientes reducidos o con un bajo pH que favorecen la estabilidad del ion ferroso (Cartron *et al.*, 2006). Como consecuencia, el transporte de  $Fe^{+2}$  está generalmente asociado a bacterias capaces de crecer en anaerobiosis y posiblemente a bajo pH. *Streptococcus mutans* acopla una flavín-reductasa asociada a membrana con un transportador de iones ferrosos. *Helicobacter pylori* secreta extracelularmente riboflavina, la cual permite la reducción del hierro a su forma ferrosa (Worst *et al.*, 1998). En bacterias anaerobias facultativas se han caracterizado dos proteínas (FeoA y FeoB) implicadas en el transporte de  $Fe^{+2}$  (Kammler *et al.*, 1993). Dado que *P. damsela* subsp. *piscicida* es una bacteria anaerobia facultativa, este sistema de asimilación de hierro podría constituir un mecanismo importante para la obtención de hierro cuando la bacteria se encuentra en ambientes anaeróbicos o a bajo pH.

### *Otros genes*

La ORF1 del clon 31 es homóloga a MadN de *Photobacterium profundum*. MadN forma parte de un operón implicado en la descarboxilación del malonato en *Malonomonas rubra* (Bagg & Neilands, 1987), si bien su función es desconocida. ORF10 muestra una identidad del 86% con una tirosil-tRNA sintasa de *P. profundum*, proteína que une tirosina a su correspondiente tRNA. ORF12 y sus homólogos constituyen proteínas de membrana que presentan unos dominios característicos de proteínas que funcionan como canales de iones. ORF13 es homóloga a BtuF, proteína que forma parte de los transportadores periplásmicos tipo ABC, y está involucrada en el transporte de la vitamina B-12 a través de la membrana plasmática (Cadieux *et al.*, 2002). ORF14 muestra una identidad del 64% con la adenosilcobinamida-fosfato sintasa de *Photobacterium* sp. SKA34. Esta proteína está involucrada en el metabolismo de la vitamina B-12, y es posible que su gen sea el responsable del fenotipo LacZ<sup>+</sup> de este clon.

Ello podría deberse a que en su secuencia codificante se halla una zona que comparte 11 nucleótidos de identidad con la caja Fur de *E. coli*.

### **1.2.2 Genes regulados por hierro en la subsp. *damsela***

La Tabla IV.3 recoge los datos de identidad y similitud entre las proteínas codificadas en los clones obtenidos del FURTA en la cepa RM-71 de la subsp. *damsela* y los homólogos más cercanos obtenidos tras un análisis comparativo con las secuencias de las bases de datos. En varios clones no se pudo identificar la secuencia consenso de la caja Fur, por lo que podrían constituir falsos positivos.

#### *Genes del operón de captación del grupo hemo*

Los genes de captación de hemo identificados en la subsp. *damsela* son homólogos a los descritos anteriormente en la subsp. *piscicida* (Lemos & Osorio, 2007; Río *et al.*, 2005). Entre ellos se encuentra el gen *tonB1*, que codifica un componente clave para proporcionar la energía para el transporte de sideróforos y grupo hemo a través de la membrana externa en bacterias Gram negativas (Braun *et al.*, 1991; Clarke *et al.*, 2001).

ORF3 codifica el receptor de membrana externa HutA para el grupo hemo, dependiente de TonB. Si bien en la subsp. *damsela* este gen es funcional, y codifica una proteína de 715 aminoácidos que está claramente regulada por hierro y juega un importante papel en la captación del grupo hemo (Río *et al.*, 2005), se ha comprobado que en algunas cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* este gen constituye un pseudogén (Osorio *et al.*, 2004).

#### *Genes candidatos de transporte de sideróforos*

ORF1 codifica el receptor de membrana externa FhuE. En algunas cepas de la subsp. *piscicida* este gen constituye un pseudogén (Osorio *et al.*, 2004), pero en cambio en las cepas de la subsp. *damsela* este gen es funcional, por lo que podría ser un candidato a constituir el receptor del sideróforo producido por la subsp. *damsela*. Debido a esta particularidad este gen será objeto de un estudio más profundo en este trabajo.



### Genes de proteínas que unen hierro

ORF13 codifica una Tiotransferasa (MiaB), proteína con actividad transferasa de grupos tipo metilo, glucosilo o acilo que presenta un grupo prostético 4Fe-4S. Su capacidad de unir hierro podría provocar una desrepresión de la fusión transcripcional, dando lugar a un falso fenotipo FURTA<sup>+</sup>. ORF7 codifica un homólogo de la ferritina. ORF12 codifica una superóxido dismutasa. Estas enzimas utilizan hierro como cofactor, por lo que la unión del hierro a esta proteína también provocaría una desrepresión de la fusión transcripcional, dando lugar al fenotipo FURTA<sup>+</sup>. ORF14 codifica una tiorredoxina, un enzima que facilita la reducción de otras proteínas a través de un intercambio tiol-disulfuro en la cisteína. Además presentan la capacidad de unirse al hierro, por lo que se ha sugerido que pueden jugar algún papel en el transporte de hierro intracelular (Kang *et al.*, 2008).

**Tabla IV.3:** ORFs predichas a partir de los clones FURTA positivos de la cepa RM-71 de *P. damsela* subsp. *piscicida*, y sus homólogos más próximos.

ORF	Homólogo	nº acceso	nº aminoácidos	% identidad aminoácidos	% similitud aminoácidos
ORF1 (C-5)	Precursor del receptor FhuE ( <i>V. angustum</i> )	GI:90440957	696	88	96
ORF2 (C-6)	TonB1 ( <i>P. profundum</i> )	GI:46913715	259	45	58
ORF3 (C-7)	Receptor de membrana externa del grupo hemo HutA ( <i>P. profundum</i> )	GI:90328759	715	74	89
ORF4 (C-12)	Formiato deshidrogenasa ( <i>V. angustum</i> )	GI:89049277	952	93	97
ORF5 (C-13)	Adenililtransferasa ( <i>V. angustum</i> )	GI:90438023	965	88	92
ORF6 (C-18)	Proteína hipotética conservada ( <i>P. leiognathi</i> subsp. <i>mandapamensis</i> )	GI:330445982	387	62	77
ORF7 (C-27)	Ferritina ( <i>P. leiognathi</i> subsp. <i>mandapamensis</i> )	GI:328491404	174	83	93
ORF8 (C-31)	Flavodoxina ( <i>P. profundum</i> )	GI:90325211	150	64	82
ORF9 (C-34)	Endoquitinasa ( <i>V. parahaemolyticus</i> )	GI:149748213	579	61	68
ORF10 (C-41)	Regulador transcripcional OpaR ( <i>P. profundum</i> )	GI:90326990	202	68	83
ORF11 (C-41)	Transportador de Fe <sup>+3</sup> tipo ABC, proteína de unión a ATP ( <i>V. fischeri</i> )	GI:59480857	344	73	79
ORF12 (C-60)	Superóxido dismutasa ( <i>P. leiognathi</i> subsp. <i>mandapamensis</i> )	GI:328490690	194	85	93
ORF13 (C-68)	Tiotransferasa MiaB ( <i>P. leiognathi</i> subsp. <i>mandapamensis</i> )	GI:328489412	474	95	98
ORF14 (C-77)	Tiorredoxina ( <i>P. leiognathi</i> subsp. <i>mandapamensis</i> )	GI:330445995	83	63	74

### **1.3 Generación y estudio de los mutantes para *fhuE* y el gen de la O-metiltransferasa**

Una vez realizado el análisis comparativo de las secuencias de los clones en ambos ensayos FURTA, encontramos genes candidatos a estar implicados en el metabolismo del hierro, así como genes implicados en la asimilación y metabolismo del grupo hemo de la hemoglobina. Seleccionamos dos genes que consideramos de especial interés. El primero codifica una O-metiltransferasa y el segundo, el gen *fhuE*, codifica un receptor de membrana externa de sideróforos dependiente de TonB. Como ya se mencionó anteriormente, además de existir metiltransferasas involucradas en la metilación de catecoles o adquisición intracelular de hierro (Pope *et al.*, 1996; Viswanathan *et al.*, 2000), el gen que codifica la O-metiltransferasa está altamente conservado en especies de la familia *Vibrionaceae*, al igual que el gen *fhuE*, y además está presente en las dos subespecies de *P. damsela*. El gen *fhuE* constituye un pseudogén en la subsp. *piscicida* (Osorio *et al.*, 2004), pero en cambio es funcional en la subsp. *damsela* y su homología con genes de receptores de sideróforos es muy alta, por lo que podría estar implicado en el transporte de sideróforos en la subsp. *damsela*. Sobre la base de estas observaciones nos propusimos estudiar, mediante su delección por intercambio alélico, el papel que puedan jugar estos dos genes. Además, construimos una fusión transcripcional entre el promotor del gen de la O-metiltransferasa y el gen *lacZ* con el objetivo de estudiar su posible regulación por hierro.

#### **1.3.1 Obtención de mutantes por intercambio alélico de los genes de la O-metiltransferasa y *fhuE***

Para obtener la secuencia completa, así como regiones adyacentes del gen de la O-metiltransferasa, realizamos una PCR inversa a partir del clon obtenido en el ensayo FURTA, hasta completar aproximadamente 2 kb a ambos lados del gen. Para la obtención de la secuencia del gen *fhuE*, nos apoyamos en la secuencia completa de la cepa tipo ATCC 33539 de la subsp. *damsela*, disponible en las bases de datos, para diseñar cebadores que permitiesen amplificar las regiones adyacentes a dicho gen (ver materiales y métodos, Tabla III.3). Construimos versiones mutadas de los genes en el vector suicida pNidia para el gen de la O-metiltransferasa (pAJR9) y pNidkan en el caso

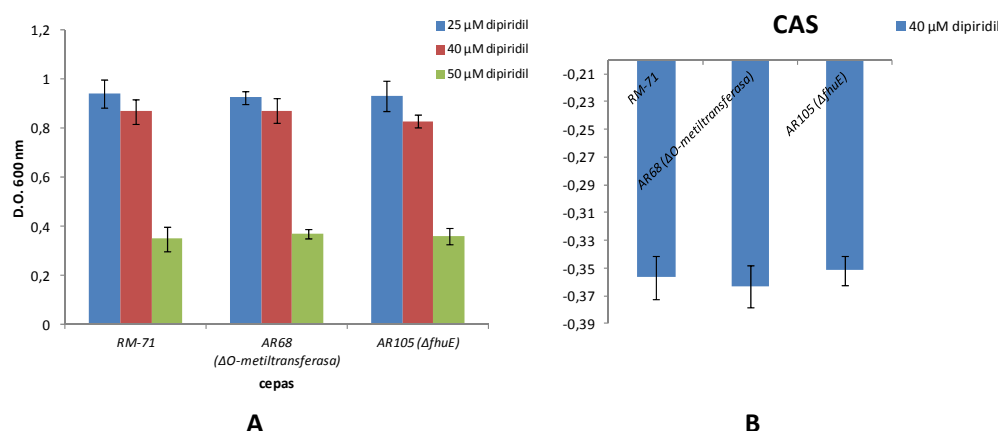
del gen *fhuE* (pAJR36). Estas construcciones fueron conjugadas a la subsp. *piscicida* y a la subsp. *damselfae* desde *E. coli* S17- $\lambda$ pir. Nos encontramos con una limitación a la hora de obtener una primera inserción del mutante para la O-metiltransferasa en la subsp. *piscicida*, ya que la cepa P3335 movía sus resistencias naturales a antibióticos a la cepa donadora de *E. coli*, incluso la resistencia a rifampicina obtenida mediante selección de mutaciones espontáneas. Por ello decidimos realizar este mutante sobre la cepa de la subsp. *damselfae* RM-71 dado que la secuencia del gen diana está conservada en ambas subespecies, y para ello clonamos la versión mutada en el vector pNidkan (pAJR9kan), para solventar la resistencia a ampicilina de la cepa RM-71. Después de obtener una primera inserción seleccionamos en medio con 15% de sacarosa una segunda recombinación que fue confirmada posteriormente mediante amplificación por PCR del alelo mutado. El resultado fue la obtención de mutantes para los genes *fhuE* (AR105) y de la O-metiltransferasa (AR68) en la cepa RM-71 de la subsp. *damselfae*.

### **1.3.2 Determinación del fenotipo de producción de sideróforos de los mutantes para los genes de la O-metiltransferasa y *fhuE***

Para determinar los efectos fenotípicos causados por las delecciones de los genes para la O-metiltransferasa y *fhuE* en la cepa RM-71 de la subsp. *damselfae*, se valoró la capacidad de crecimiento de los respectivos mutantes (cepas AR68 y AR105) en condiciones de limitación de hierro en relación con la cepa parental, así como su capacidad de producir sideróforos, obteniéndose los resultados mostrados en la Figura IV.3.

Después de analizar los resultados pudimos comprobar que las mutaciones de los genes de la O-metiltransferasa y *fhuE* no causaron ninguna deficiencia en el crecimiento en condiciones de limitación de hierro, y tampoco se observaron diferencias en cuanto a los valores obtenidos en los ensayos de producción de sideróforos mediante el ensayo CAS en sobrenadantes. Estos resultados sugieren que o bien estos genes no juegan un papel decisivo en la asimilación de hierro mediante sideróforos, o bien existen genes alternativos en el genoma que suplen la delección de estos genes.

**Figura IV.3:** Pruebas de crecimiento de las cepas parental, mutantes de la O-metiltransferasa (AR68) y *fhuE* (AR105) bajo diferentes condiciones de limitación de hierro. Las mediciones se realizaron 12 h después de la inoculación: (A) crecimiento de las cepas en diferentes concentraciones del agente quelante 2,2'-dipiridil y (B) valores de CAS sobrenadante a 40  $\mu$ M de 2,2'-dipiridil.



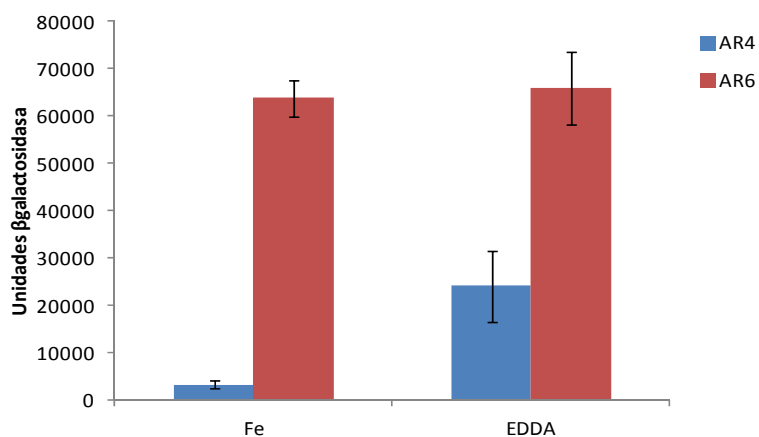
### 1.3.3 Estudio de la regulación transcripcional del gen de la O-metiltransferasa

La delección del gen de la O-metiltransferasa no provocó variaciones fenotípicas, pero dado que en su región promotora se encuentra una caja Fur que comparte 16 de las 19 bases con la secuencia consenso de la caja Fur de *E. coli* (de Lorenzo *et al.*, 1987), nos propusimos examinar si el promotor de dicho gen se halla regulado por la proteína Fur. El plásmido con la región promotora (pAJR4) se introdujo en las cepas de *V. anguillarum* 775 (AR4) y 775met11 *fur*<sup>-</sup> (AR6). Las cepas se cultivaron en condiciones de exceso y limitación de hierro, permitiéndonos estudiar si este promotor está regulado por la concentración de hierro.

La utilización de la cepa de *V. anguillarum* 775met11 *fur*<sup>-</sup> (mutante deficiente en la proteína represora Fur) nos permitió determinar si este promotor está o no regulado por la proteína Fur. En exceso de hierro (16  $\mu$ M), el promotor se encuentra reprimido en la cepa parental (AR4), pero en presencia del agente quelante de hierro EDDA 5  $\mu$ M (condiciones restrictivas de hierro), se produce una desrepresión del promotor, consiguiéndose una expresión de la  $\beta$ -galactosidasa de hasta 6 veces mayor que en presencia de hierro (Figura IV.4). Sin embargo, cuando analizamos la expresión del gen indicador *lacZ* en la cepa mutante que carece del represor Fur, los valores fueron similares tanto en condiciones de exceso como de deficiencia de hierro. Esto es debido a que al no existir represión mediada por la proteína Fur en la cepa mutante, no se

produce regulación de la expresión del promotor del gen de la O-metiltransferasa (Figura IV.4). Esto demuestra que este gen está regulado por la concentración de hierro del medio, y dicha regulación es ejercida, al menos en parte, por la proteína represora Fur.

**Figura IV.4:** Resultados de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión transcripcional entre el promotor del gen de la O-metiltransferasa y el gen *lacZ*. El ensayo se realizó en las cepas de *V. anguillarum* 775 (AR4) y 775met11 *fur*<sup>-</sup> (AR6) con el pAJR4 crecida en exceso y déficit de hierro.





## **2. Aplicación de la hibridación sustractiva al estudio de la diversidad genética en *P. damsela***

La aplicación del ensayo de titulación de Fur (FURTA) nos permitió identificar una serie de genes claramente relacionados con el metabolismo del hierro en *P. damsela*, sin embargo no fue posible identificar claramente aquellos genes involucrados en la síntesis y transporte de sideróforos. Experimentos previos demostraron que las cepas de la subsp. *piscicida* producen sideróforos que no son ni de tipo hidroxamato ni de tipo catecol (Magariños *et al.*, 1994b). En cambio, las cepas de la subsp. *damsela* producen sideróforos de tipo hidroxamato (Fouz *et al.*, 1997). Esta diferencia en cuanto a la naturaleza química del sideróforo producido, sugiere que los genes que intervienen en la síntesis y la utilización de sideróforos difieren también entre ambas subespecies, por lo que nos hemos planteado la utilización de la hibridación sustractiva como método para esclarecer la base genética de los sistemas de captación de hierro mediante sideróforos en *P. damsela*. Esta metodología permite obtener genes específicos que se encuentran en una cepa (cepa test) y están ausentes en la cepa con la que se compara (cepa control) (Rosok & Sioud, 2007). Así, en primer lugar realizamos un ensayo de hibridación sustractiva utilizando una cepa de procedencia japonesa de la subsp. *piscicida* como cepa test y una cepa de la subsp. *damsela* como cepa control, y un segundo ensayo en el que se cambió el orden de las cepas utilizadas en la primera hibridación. Además de genes relacionados con la captación de hierro, esperábamos obtener genes diferenciales que permitiesen esclarecer la base genética de las diferencias fenotípicas entre las dos subespecies, así como identificar genes de posibles factores de virulencia en la subespecie *damsela*.

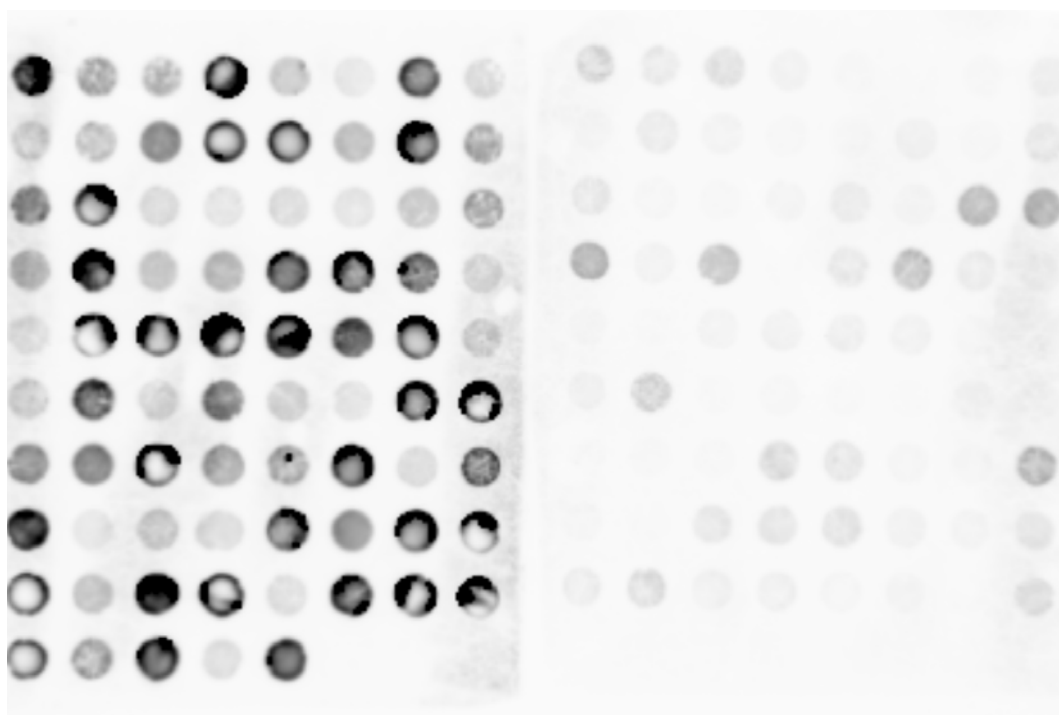
### **2.1 Selección de fragmentos génicos específicos de las cepas P3335 y RM-71 mediante hibridación sustractiva**

Como resultado de la aplicación de la hibridación sustractiva al estudio de las diferencias genéticas entre las cepas P3335 y RM-71 de las subsp. *piscicida* y *damsela* respectivamente, se obtuvieron una serie de fragmentos de ADN específicos de cada cepa. Estos fragmentos se clonaron en el vector *pGEM-T Easy*, y se seleccionaron 68

clones portadores de fragmentos específicos de la cepa P3335 y 90 clones portadores de fragmentos específicos de la cepa RM-71.

### **2.1.1 Identificación de fragmentos génicos específicos de la cepa P3335 de la subsp. *piscicida***

En este ensayo utilizamos como cepa test la cepa P3335 de *P. damselae* subsp. *piscicida*, y como cepa control, la cepa RM-71 de *P. damselae* subsp. *damselae*. Los tamaños de los fragmentos sustraídos estuvieron comprendidos entre los 500 y 1.500 pb. Todos los clones obtenidos fueron secuenciados y posteriormente sometidos a un ensayo de hibridación *Southern Blot* para confirmar la presencia de las correspondientes secuencias en una cepa y su ausencia en la otra (Figura IV.5).



**Figura IV.5:** Hibridaciones tipo *Dot Blot* realizadas con fragmentos génicos de la cepa P3335 de *P. damselae* subsp. *piscicida* obtenidos por hibridación sustractiva. Dichos fragmentos se sometieron a hibridación con ADN marcado de la cepa P3335 de la subsp. *piscicida* (membrana de la izquierda) y con ADN marcado de la cepa RM-71 de la subsp. *damselae* (membrana de la derecha) con el fin de identificar los fragmentos específicos de la cepa P3335.

De los 79 clones obtenidos, no fue posible obtener la secuencia de 11 de ellos. A partir de las secuencias de los 68 clones restantes, se describen a continuación aquellos genes cuyos homólogos han sido caracterizados (Tabla IV.4). Cuatro clones (cPHDP5, 15,



20 y 29) no mostraron homología alguna en las bases de datos y el clon cPHDP28 resultó ser un falso positivo.

#### **2.1.1.1 Genes de transposasas y otros elementos móviles en *P. damsela* subsp. *piscicida***

La técnica de hibridación sustractiva ha demostrado ser de utilidad para detectar la presencia diferencial de elementos de inserción en bacterias (Juiz-Río *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009). Veintinueve de los 56 clones contenían una de las 4 transposasas que están presentes en la cepa test y ausentes en la cepa control. Dos de las secuencias de inserción muestran homologías con las transposasas A y B de *P. damsela* subsp. *piscicida*, una tercera transposasa mostró homología con transposasas descritas en plásmidos de *P. damsela* subsp. *piscicida* (Kim *et al.*, 2008; do Vale *et al.*, 2005), y una cuarta mostró homología con una transposasa de *Klebsiella pneumoniae*. Hemos observado que varios clones portan las transposasas A y B (6 clones presentan la transposasa A y 2 presentan la transposasa B), pero curiosamente las zonas flanqueantes de estos elementos de inserción varían entre clones, indicando que estos genes se encuentran en multicopia en el cromosoma. Las transposasas contribuyen de forma notable a la evolución del tamaño de los genomas bacterianos. Estos genes experimentan su propia presión selectiva a la hora de expandirse, por lo que los cambios en el tamaño del genoma pueden estar en parte conducidos por la dinámica co-evolutiva entre transposasas y hospedador (Agren & Wright, 2011). Esta dinámica juega con toda probabilidad un papel clave en la evolución bacteriana, facilitando reordenamientos genómicos y nuevas adquisiciones de genes mediante transferencia horizontal (Mahillon *et al.*, 1999).

Los clones cPHDP3, 4, 19, 22, 23, 41, 49, y 51 mostraron una alta similitud con genes plasmídicos ya descritos en *P. damsela* subsp. *piscicida*, lo que sugiere que alguno de estos plásmidos también forme parte de la cepa P3335 de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Los clones cPHDP47 y cPHDP60 codifican homólogos de integrasas de fagos de diferentes especies. Esta clase de proteínas intervienen en recombinaciones específicas de sitio entre dos secuencias de ADN (Groth & Calos, 2004). Normalmente están involucradas en la integración en el cromosoma bacteriano de fagos y elementos móviles como las islas de patogenicidad (Schubert *et al.*, 2004).

### **2.1.1.2 Genes candidatos relacionados con la virulencia y con mecanismos de resistencia.**

Alguna de las proteínas descritas en la Tabla IV.4 podrían estar relacionadas con la virulencia en *P. damsela* subsp. *piscicida*. Así, por ejemplo, el clon cPHDP2 codifica un componente de un sistema de secreción de tipo III (T3SS), una sofisticada maquinaria que permite a las bacterias Gram negativas introducir citotoxinas en las células eucariotas (Enninga & Rosenshine, 2009). Por otra parte, el clon cPHDP7 codifica un homólogo de una tirosina-kinasa involucrada en la regulación de la síntesis del polisacárido capsular, y que se ha demostrado que juega un importante papel en la virulencia de *Klebsiella pneumoniae* (Lin *et al.*, 2009b).

El clon cPHDP39 codifica un homólogo de la proteína de membrana externa AsmA. Ésta se halla involucrada en la regulación de la resistencia a la bilis. También es considerada como un factor de virulencia ya que en *Salmonella* los mutantes *asma* mostraron una considerable reducción en su habilidad para invadir *in vitro* células epiteliales (Prieto *et al.*, 2009). El clon cPHDP46 contiene un ORF homólogo a *arsA*, un gen que controla negativamente la expresión de los genes involucrados en la resistencia al arsénico. Estos genes se pueden encontrar formando parte de plásmidos (Ryan & Collieran, 2002).

### **2.1.1.3 Genes relacionados con el metabolismo del ADN**

El clon cPHDP17 codifica una proteína que presenta un dominio conservado (YfbU). En *E. coli* este dominio es requerido para procesos de muerte celular mediados por MazF después de un daño al ADN (Amitai *et al.*, 2009). Los clones cPHDP23 y cPHDP57 codifican metilasas de ADN. Una de ellas (clon cPHDP23), es específica de citosina. Esta clase de proteínas están involucradas en la protección del ADN mediante metilación de bases específicas, evitando la acción de los sistemas de restricción-modificación (Chen *et al.*, 2008). Estos sistemas actúan protegiendo el ADN propio mediante metilación y degradan el ADN exógeno procedente de plásmidos promiscuos o bacteriófagos mediante restricción (Cohen, 1993; Sanders, 1988). El clon cPHDP55 contiene una ORF que muestra homología con el gen *tldD*. En *E. coli*, este gen codifica una proteasa involucrada en la regulación de la función de la ADN girasa (Allali *et al.*, 2002).

Los clones cPHDP9, 10, 11, 33, 34, 42, 62 y 64 mostraron homología con proteínas involucradas en el metabolismo general bacteriano, como mantenimiento y duplicación de ADN u obtención de energía. El clon cPHDP61 codifica una proteína que presenta homología con KfrA. Se trata de una proteína de unión al ADN que pertenece a un operón tricistrónico que se halla involucrado en el control de la replicación de plásmidos en la célula (Adamczyk *et al.*, 2006).

#### **2.1.1.4 Genes relacionados con transporte de metabolitos y secreción/modificación de macromoléculas**

El clon cPHDP28 codifica una proteína con un dominio tipo YfgL, involucrado en el ensamblaje de lipoproteínas de membrana externa (Kim *et al.*, 2007). El clon cPHDP29 codifica una proteína homóloga a VirB6 de *V. fischeri*. En *Agrobacterium tumefaciens* esta proteína se encuentra en la membrana interna y forma parte de un complejo proteico involucrado en la formación del pili tipo T y el canal de secreción (Jakubowski *et al.*, 2003). Por otra parte, el clon cPHDP34 codifica un homólogo de proteínas involucradas en el transporte de aminoácidos a través de la membrana.

El clon cPHDP41 contiene dos ORF, que codifican homólogos de proteínas descritas en plásmidos de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Además, una de ellas muestra homología con proteínas Factor Willebrand tipo A, que intervienen en el plegamiento/activación de proteínas y complejos proteicos mediante la inserción de cofactores metálicos (Snider & Houry, 2006).

**Tabla IV.4:** Descripción de las ORFs identificadas en la subsp. *piscicida* y sus homólogos más cercanos.

Clon	Longitud (pb) (ORF)	Longitud (aa) (homólogo)	Homólogo	Identidad	Similitud	Nº acceso
cPHDP1	115	402	Transposasa ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> )	100	100	GI:288551481
cPHDP2	740	528	Proteína V sistema de secreción tipo III ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> )	100	100	GI:51860713
cPHDP3	956	1847	Proteína hipotética ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> )	99	99	GI:118601954
cPHDP4	290	86	Transposasa ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> )	100	100	GI:57635349
cPHDP7	734	718	Tirosina kinasa ( <i>Grimontia hollisia</i> )	61	77	GI:262276299
cPHDP9	320	148	Dehidrogenasa ( <i>P. profundum</i> )	81	87	GI:54308964
cPHDP10	272	178	Proteína hipotética ( <i>Shewanella pealeana</i> )	87	94	GI:157960734
cPHDP11	287	137	Factor de iniciación IF3 ( <i>V. angustum</i> )	88	92	GI:90579636
cPHDP12	329	335	Proteína hipotética ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> )	71	85	GI:269105247
cPHDP17	359	183	Proteína hipotética ( <i>Desulfovibrio salexigens</i> )	47	68	GI:242279831
cPHDP19	455	141	Transposasa B ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> )	98	100	GI:57635367
cPHDP21	485	609	Receptor de membrana externa de cobalamida (BtuB) ( <i>P. profundum</i> )	67	82	GI:90414702
cPHDP22	413	143	Proteína hipotética ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> )	98	99	GI:118601987
cPHDP23	242	541	Metilasa específica de citosina ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> )	100	100	GI:118601986
cPHDP28	443	112	Proteína hipotética ( <i>V. angustum</i> )	50	72	GI:90581714
cPHDP29	332	344	Proteína de canal VirB6 ( <i>V. fischeri</i> )	35	51	GI:59714411
cPHDP33	734	455	Proteína F inducida por daño al ADN ( <i>V. angustum</i> )	81	88	GI:90581405
cPHDP34	459	464	Transportador de aminoácidos ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> )	99	99	GI:269102915
cPHDP39	341	651	Proteína hipotética ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> )	89	94	GI:269103700
	278	598	Factor tipo A von Willebrand ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> )	100	100	GI:118601973
cPHDP41	329	111	Proteína hipotética ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> )	100	100	GI:118601974
cPHDP42	545	1388	MukB ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> )	100	100	GI:269102451
cPHDP44	794	324	Proteína hipotética ( <i>V. angustum</i> )	39	60	GI:90578727
cPHDP45	143	62	Proteína hipotética ( <i>V. harveyi</i> )	79	91	GI:156976028
cPHDP46	242	65	Regulador transcripcional ArsR ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> )	100	100	GI:118601905
cPHDP47	977	526	Integrasa de fago ( <i>Psychrobacter cryohalolentis</i> )	29	50	GI:93006194
cPHDP49	308	100	Proteína hipotética ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> )	100	100	GI:118614777
cPHDP51	281	150	Proteína hipotética ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> )	88	91	GI:288551480
cPHDP55	239	461	Proteína tipo TldD ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> )	98	100	GI:269104703
cPHDP57	542	524	Sistema restricción-modificación subunidad M ( <i>V. splendidus</i> )	84	90	GI:84390142
cPHDP60	473	531	Integrasa de fago ( <i>V. alginolyticus</i> )	90	94	GI:91225637
cPHDP61	332	346	KfrA ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> )	100	100	GI:118602014
cPHDP62	476	459	Succinil-CoA sintasa ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> )	98	98	GI:269104366
cPHDP64	389	584	Formiato tetrahidrofolato ligasa ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> )	98	99	GI:269102055
cPHDP68	182	122	Regulador transcripcional ( <i>V. shilonii</i> )	73	81	GI:149190937
cPHDP71	101	238	Transposasa ( <i>Acinetobacter baumannii</i> )	100	100	GI:184159991

### **2.1.2 Identificación de fragmentos génicos específicos de la cepa RM-71 de la subsp. *damselae***

En este ensayo utilizamos como cepa test la cepa RM-71 de *P. damselae* subsp. *damselae*, y como cepa control la cepa P3335 de *P. damselae* subsp. *piscicida*. Los tamaños de los fragmentos sustraídos están comprendidos entre las 300 y 500 pb. Todos los clones obtenidos fueron secuenciados y con estas secuencias se realizó un análisis comparativo con el genoma de la cepa DI-21 de *P. damselae* subsp. *piscicida*, secuenciado en nuestro laboratorio, para descartar posibles falsos positivos. Mediante este análisis pudimos identificar genes que son exclusivos de la cepa RM-71 de la subsp. *damselae* (Tabla IV.5).

*P. damselae* subsp. *damselae* presenta una serie de características fenotípicas diferenciales con respecto a *P. damselae* subsp. *piscicida*. A pesar de la existencia de una alta similitud genética entre ambas subespecies, dicha variabilidad fenotípica debería implicar una base genética diferencial. Por este motivo consideramos que la realización de una hibridación sustractiva de una cepa de la subsp. *damselae* frente a una cepa de la subsp. *piscicida* nos permitirá obtener información sobre qué genes podrían estar detrás de las diferencias fenotípicas observadas entre ambas. Como era de esperar, obtuvimos un número de genes específicos de la subsp. *damselae* significativamente mayor (más del doble) que el obtenido cuando utilizamos la subsp. *piscicida* como cepa test. Curiosamente, a diferencia de los resultados obtenidos con la subsp. *piscicida* no obtuvimos ningún homólogo de genes de transposasas en la subsp. *damselae*. A continuación se describen agrupados en grupos funcionales los genes cuyos homólogos han sido caracterizados.

#### **2.1.2.1 Genes relacionados con plásmidos**

Los clones cPHDP 67, 77, 103, 145 y 159 codifican respectivamente homólogos de una resolvasa, así como de RepA, TraW, TraC y una proteína relacionada con sistemas de partición. Estas proteínas suelen codificarse en plásmidos, lo que sugiere que la subsp. *damselae* podría presentar algún plásmido del que carece la subsp. *piscicida*. El contexto genético de estos genes será objeto de estudio en capítulos posteriores, dado el interés del contenido plasmídico de esta subespecie. En este

sentido, estudios previos han relacionado el contenido plasmídico con la virulencia de *P. damsela* subsp. *damsela* (Fouz *et al.*, 1992; Takahashi *et al.*, 2008).

#### **2.1.2.2 Genes relacionados con la virulencia**

Los clones cPHDD7 y 20 codifican homólogos de hemaglutininas/adhesinas. Estas proteínas muestran homologías con toxinas tipo RTX de diferentes especies dentro de la familia *Vibrionaceae*. Las toxinas RTX (*repeat in toxin*) constituyen un rango amplio de exoproteínas que juegan un papel importante en la colonización de varios hábitats y hospedadores en bacterias Gram negativas. Se caracterizan estructuralmente por presentar repeticiones de 9 aminoácidos ricos en glicina que permiten la unión de iones  $\text{Ca}^{+2}$ . También se caracterizan por ser secretadas mediante sistemas de secreción de tipo I. Estas toxinas actúan como factores de virulencia provocando daño tisular y/o la producción de mediadores de la respuesta inflamatoria (Linhartova *et al.*, 2010). El clon cPHDD24 muestra homología con *vep07*, una toxina de *V. vulnificus* perteneciente a la familia de las RTX que juega un importante papel en la virulencia de esta bacteria frente a anguilas (Lee *et al.*, 2008).

Los clones cPHDD39 y 151 codifican proteínas con dominios lectina. Las lectinas son adhesinas implicadas en el reconocimiento de glucoconjugados situados en la membrana celular eucariota. Las adhesinas son factores de virulencia esenciales en el proceso de colonización de diferentes ambientes o estructuras celulares. En *E. coli*, por ejemplo, juegan un importante papel en la colonización intestinal o extraintestinal (Hacker, 1992). Se ha demostrado que en *Pseudomonas aeruginosa* las lectinas juegan un importante papel en la adherencia de las células bacterianas, actuando como factores de virulencia puesto que la adherencia es un paso crucial en los primeros estadios de la infección causada por *P. aeruginosa* (Chemani *et al.*, 2009).

El clon cPHDD72 codifica una lipoproteína que muestra homología con StcE de *E. coli*. StcE es secretada por cepas enterohemorrágicas de *E. coli* y contribuye a la adherencia de la bacteria a la célula hospedadora, aspecto esencial en el proceso de colonización. Se ha demostrado que StcE es un factor de virulencia que presenta actividad mucinasa y que actúa como agente antiinflamatorio afectando a la formación del complemento (Grys *et al.*, 2006). Se ha demostrado en *Aeromonas hydrophila*, que

la mutación de *tagA*, homólogo de *stcE*, provoca una reducción de la virulencia en ratón (Pillai *et al.*, 2006). En *V. cholerae* *tagA* se encuentra formando parte de una isla de patogenicidad que incluye los determinantes de virulencia ToxT, TCP y ACF (Karaolis *et al.*, 1998).

Los clones cPHDD25, 41 y 217 codifican dos proteínas que presentan dominios GGDEF/EAL. Estos dominios son característicos de enzimas implicados en la síntesis y degradación del 3',5'-diguanylate cíclico (*c-di-GMP*). Este compuesto está involucrado en la regulación de procesos como formación de biofilms, expresión de factores de adherencia o regulación de genes de virulencia (Jenal & Malone, 2006). También hemos observado que el clon cPHDD130 contiene un homólogo de *bvgS*, un gen que forma parte de un operón bicistrónico que regula rutas de respuesta/estímulo en el patógeno de mamíferos *Bordetella pertussis* (Gerlach *et al.*, 2004). BvgS es una kinasa que fosforila a BvgA, un regulador que controla la transcripción de genes de virulencia (Uhl & Miller, 1996). Además de estos genes reguladores de virulencia, hemos encontrado homólogos de reguladores de tipo AraC (cPHDD34 y 88). Los reguladores de tipo AraC suelen actuar como activadores de la transcripción de diversos factores, entre ellos, factores de virulencia como la producción de sideróforos. En *Yersinia* se ha demostrado la necesidad de un activador de tipo AraC para alcanzar niveles máximos de expresión de los genes de biosíntesis del sideróforo yersiniabactina (Fetherston *et al.*, 1996).

El clon cPHDD143 contiene el gen *dly*. Su producto, la damselsina, es una potente toxina con actividad fosfolipasa D frente a esfingomielina (Kreger *et al.*, 1987). El gen *dly* será objeto de estudio posteriormente en este trabajo (ver apartados 3 y 4).

#### **2.1.2.3 Genes relacionados con el transporte o la secreción de diversos compuestos**

Los clones cPHDD6, 38, 82, 203, y 208 codifican homólogos de transportadores de membrana, la mayoría permeasas, que permiten la internalización de solutos de diversa naturaleza. En otros casos, el tipo de soluto es más específico como ocurre con los clones cPHDD14, 22, 36, 123, 152, 127, 171, y 176, los cuales codifican homólogos implicados en el transporte de alanina, sodio, fosfato, mononucleótido de nicotinamida, ribosa, aminoazúcares, ácido siálico y serina, respectivamente.

Además, hemos encontrado genes relacionados con resistencia a diferentes compuestos. La secuencia del clon cPHDD76 muestra homología con *terC*, un gen implicado en la resistencia a telurito de potasio. Esta resistencia se encuentra comúnmente en aislados clínicos de *E. coli* (Orth *et al.*, 2007) así como en diversas bacterias patógenas (Taylor, 1999). Los clones cPHDD70, 139 y 140 muestran homología con *acrB*, *emrA* y *emrB* respectivamente. Estos genes forman parte de bombas que permiten la expulsión de una variedad de agentes antimicrobianos fuera de la célula como es el caso de los genes *emrAB* involucrados en resistencias a antibióticos (Colmer *et al.*, 1998) o *acrB* involucrado en la resistencia a los ácidos biliares (Thanassi *et al.*, 1997), potentes detergentes que rompen las membranas biológicas. También hemos encontrado genes relacionados con varios sistemas de secreción. Así, los clones cPHDD51 y 208 codifican homólogos de HlyD y RtxB respectivamente, que forman parte de un sistema de secreción de tipo I. Estos sistemas se hallan involucrados en la secreción de toxinas al exterior celular (Boardman & Satchell, 2004). Se han encontrado otros homólogos de sistemas de secreción, como es el caso del clon cPHDD240 que codifica un componente de un sistema de secreción de tipo VI. En *V. cholerae*, los genes que pertenecen a este sistema se denominan genes VAS (secreción asociada a la virulencia), y se ha demostrado que los mutantes que tienen afectados estos genes presentan una virulencia atenuada en ensayos *in vivo* con animales e *in vitro* con macrófagos (Pukatzki *et al.*, 2006). El clon cPHDD10 codifica un homólogo de un componente de sistemas de secreción de tipo II. Este sistema es uno de los seis sistemas de secreción que existen en bacterias Gram negativas cuyo papel es secretar proteínas al medio extracelular o al interior de la célula diana (Hwang *et al.*, 2011). Los clones cPHDD92 y 95 codifican dos proteínas que pertenecen al operón MSHA (Hemaglutinina sensible a manosa). Este operón forma parte del sistema de secreción de tipo IV y está involucrado en la síntesis y expresión de la hemaglutinina MSHA que interviene en la producción de biofilms en superficies abióticas y en *V. cholerae* parece haberse adquirido mediante transferencia horizontal (Marsh & Taylor, 1999).



#### 2.1.2.4 Genes que podrían explicar las diferencias fenotípicas entre las dos subespecies

Tal y como nos habíamos planteado al principio de este ensayo, tras la aplicación de la hibridación sustractiva esperaríamos identificar genes que explicasen las diferencias fenotípicas observadas entre ambas subespecies. De este modo, los clones cPHDD141 y 214 que codifican homólogos de FlaK y FliD respectivamente, proteínas implicadas en la formación del flagelo, podrían explicar la diferente movilidad que estas bacterias presentan, ya que la subsp. *piscicida* es inmóvil mientras que la subsp. *damselae* presenta movilidad por flagelos.

Los clones cPHDD173 y 174 codifican homólogos de la nitrito reductasa NirB y una óxido nítrico reductasa respectivamente. Estos enzimas intervienen en la reducción del ión nitrato (Watmough *et al.*, 2009; Malm *et al.*, 2009). Las nitrito reductasas convierten el ión nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) en óxido nítrico (NO) y las óxido nítrico reductasas lo convierten en óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ). Se sabe que la subsp. *damselae* presenta la capacidad de reducir nitratos, de la cual carece la subsp. *piscicida*. La nitrito reductasa (NirB) es vital en la asimilación del nitrógeno. Se induce en condiciones anaeróbicas y permite la detoxificación del nitrito acumulado tras la reducción del nitrato. Aunque no intervienen directamente en esta reacción, estas enzimas intervienen en reacciones posteriores, por lo que están directamente relacionadas con la capacidad de reducir nitratos.

Los clones cPHDD57 y 183 codifican homólogos de chaperonas. Estas proteínas intervienen en el correcto plegado proteico y mantienen proteínas ya existentes en una conformación estable, evitando su agregación bajo condiciones de estrés (Muga & Moro, 2008), por lo que guardan relación con la capacidad de crecer a diferentes temperaturas. En *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, la mutación de un homólogo del gen *htpG* muestra una reducción del 50% en la capacidad de crecimiento a 42 °C (Winston *et al.*, 1996). El clon cPHDD57 codifica un homólogo de HtpG, por lo que estas chaperonas podrían estar relacionadas con la capacidad de crecer a 37 °C que presenta la subsp. *damselae* y de la cual carece la subsp. *piscicida*.

Una diferencia fenotípica observada entre ambas subespecies es la capacidad de producir ácido de maltosa, que es característica de la subsp. *damselae*. Los clones

cPHDD13 y 32 muestran homología con *malE* y *malG* respectivamente. Estos genes forman parte de un operón implicado en el transporte de maltosa al interior celular (Nikaido, 1994), y podrían explicar la capacidad de producir ácido de maltosa de la subsp. *damsela*.

La subsp. *damsela* es capaz de producir hemólisis en diferentes especies de eritrocitos. Tal y como se ha descrito más arriba, la presencia del gen *dly* en el clon cPHDD143 y la ausencia de este gen en la subsp. *piscicida* sería una de las explicaciones moleculares del fenotipo hemolítico mostrado por la subsp. *damsela* y de la ausencia de hemólisis en la subsp. *piscicida* (ver apartados 3 y 4 de resultados).

Los clones cPHDD8 y 84 codifican un transportador de tipo antiportador para histidina/histamina y un ARNt para la histamina. Se ha descrito que el gen *hdcA*, que es una histidín decarboxilasa, presenta en un mismo gen las actividades codificadas en dichos clones. El gen *hdcA* se expresa bajo condiciones de pH bajo y exceso de histidina en *P. damsela* subsp. *damsela* (Kimura *et al.*, 2009), y forma parte de un operón involucrado en la producción de histamina, característica que podría ser una diferencia fenotípica más a añadir a las ya conocidas entre ambas subespecies.

**Tabla IV.5:** Identificación de las ORFs específicas de la subsp. *damselfae*, y sus homólogos más cercanos.

Clon	Longitud (pb) (ORF)	Longitud (aa) (homólogo)	Homólogo	Identidad	Similitud	Nº acceso
cPHDD3	180	1055	Quitodextrinasa ChiC ( <i>V. splendidus</i> )	79	90	GI:342810420
cPHDD4	261	177	Proteína sistema de secreción tipo I ( <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> )	23	42	GI:322648254
cPHDD5	384	378	Acetilornitina deacetilasa ArgE ( <i>P. profundum</i> )	82	91	GI:54309744
cPHDD6	162	536	Permeasa ( <i>V. rotiferianus</i> )	55	73	GI:350533873
cPHDD7	309	1687	Hemaglutinina ( <i>P. leiognathi</i> subsp. <i>mandapamensis</i> )	56	70	GI:330448536
cPHDD8	255	434	Transportador de histidina/histamina ( <i>Haemophilus aegyptius</i> )	69	78	GI:329122465
cPHDD10	666	445	Proteína sistema de secreción tipo II/IV ( <i>Aliivibrio salmonicida</i> )	76	86	GI:208010732
cPHDD12	300	372	Fosforibosilaminoimidazol carboxilasa ( <i>V. angustum</i> )	65	72	GI:90581181
cPHDD13	303	175	Transportador de Maltosa MalE ( <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> )	75	86	GI:348003376
cPHDD14 <sup>(1)</sup>	108	515	Transportador sodio/alanina ( <i>V. splendidus</i> )	86	89	GI:84387653
cPHDD18 <sup>(1)</sup>	438	738	Glucosil transferasa ( <i>E. coli</i> )	49	67	GI:300949429
cPHDD20	417	5580	Proteína hipotética ( <i>V. angustum</i> )	65	70	GI:90578131
cPHDD22	201	553	Permeasa transporte fosfato PstA ( <i>P. profundum</i> )	96	100	GI:90414595
cPHDD24	303	387	Proteína homóloga a vep07 ( <i>V. vulnificus</i> )	41	55	GI:222430903
cPHDD25	426	562	Proteína con dominio GGDEF ( <i>V. angustum</i> )	35	50	GI:90577828
cPHDD27	402	850	Proteína hipotética ( <i>V. mimicus</i> )	37	58	GI:262163742
cPHDD30	273	875	Glucosil hidrolasa ( <i>P. leiognathi</i> subsp. <i>mandapamensis</i> )	56	76	GI:330447655
cPHDD31	297	901	$\alpha$ 1-2 manosidasa ( <i>V. harveyi</i> )	83	90	GI:153832188
cPHDD32	180	183	Transportador de Maltosa MalG ( <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> )	100	100	GI:289812143
cPHDD34	387	373	Regulador tipo AraC ( <i>P. profundum</i> )	48	68	GI:90411800
cPHDD36 <sup>(1)</sup>	294	244	Transportador de ribosil nicotinamida PnuC ( <i>V. mimicus</i> )	76	88	GI:262173029
cPHDD37	258	2204	Proteína hipotética ( <i>P. leiognathi</i> subsp. <i>mandapamensis</i> )	54	69	GI:330448675
cPHDD38	621	317	Permeasa ( <i>V. rotiferianus</i> )	81	91	GI:350529958
cPHDD39	303	7691	Proteína citosólica ( <i>V. angustum</i> )	53	77	GI:90578281
cPHDD40	234	568	Subunidad terminasa de bacteriófago ( <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> )	60	72	GI:51596146
cPHDD41	507	561	Proteína hipotética de membrana ( <i>V. fischeri</i> )	31	51	GI:197337021
cPHDD44	216	4981	Hemolisina ( <i>P. leiognathi</i> subsp. <i>mandapamensis</i> )	37	59	GI:330447993
cPHDD51	330	464	Proteína de secreción toxinas HlyD ( <i>V. angustum</i> )	80	94	GI:90578132
cPHDD55	360	379	Proteína de membrana ( <i>P. profundum</i> )	73	89	GI:90410495

**Tabla IV.5:** Cont.

Clon	Longitud (pb) (ORF)	Longitud (aa) (homólogo)	Homólogo	Identidad	Similitud	Nº acceso
cPHDD57	288	635	Chaperona HtpG ( <i>V. fumiisii</i> )	81	90	GI:260769082
cPHDD58	177	560	Proteína de membrana externa ( <i>V. rotiferianus</i> )	76	92	GI:350533973
cPHDD60	360	584	Hidrogenasa ( <i>P. leiognathi</i> subsp. <i>mandapamensis</i> )	92	98	GI:330448645
cPHDD63 <sup>(1)</sup>	318	264	Proteína hipotética ( <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> )	36	57	GI:218665563
cPHDD67	237	198	Resolvasa ( <i>P. leiognathi</i> subsp. <i>mandapamensis</i> )	82	86	GI:330448834
cPHDD70	237	1016	Transportador familia AcrB/D/F ( <i>Grimontia hollisae</i> )	97	97	GI:269104893
cPHDD72	207	886	Lipoproteína regulada por ToxR ( <i>E. coli</i> )	72	83	GI:291285870
cPHDD74	231	384	Amidohidrolasa ( <i>Shewanella halifaxensis</i> )	90	91	GI:167622112
cPHDD76	471	255	Proteína transmembrana ( <i>P. profundum</i> )	84	90	GI:54301967
cPHDD77 <sup>(1)</sup>	693	296	Replicasa ( <i>V. cholerae</i> )	58	75	GI:219372122
cPHDD80	171	712	Metilasa ( <i>V. angustum</i> )	91	91	GI:90578614
cPHDD82	411	359	Transportador ( <i>V. corallilyticus</i> )	89	93	GI:260776854
cPHDD84	237	442	Histidil-tRNA sintetasa ( <i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>necessarius</i> )	71	79	GI:171463403
cPHDD88	120	267	Regulador tipo AraC ( <i>P. profundum</i> )	69	86	GI:90409776
cPHDD90 <sup>(1)</sup>	381	242	Uridín fosforilasa ( <i>V. vulnificus</i> )	70	83	GI:37675871
cPHDD92	174	559	Proteína de formación de pili MshL ( <i>P. profundum</i> )	81	96	GI:90412971
cPHDD95	123	242	Proteína de formación de pili PilW ( <i>V. angustum</i> )	72	87	GI:90580171
cPHDD98	198	483	Glutacion sintetasa ( <i>V. splendidus</i> )	54	76	GI:218675859
cPHDD100	537	165	Proteína hipotética ( <i>V. splendidus</i> )	52	67	GI:218676411
cPHDD103	255	256	Proteína de ensamblaje y síntesis del pili TraW ( <i>P. profundum</i> )	61	78	GI:269105015
cPHDD108 <sup>(1)</sup>	210	389	3-cetoacil-CoA tiolasa ( <i>V. fischeri</i> )	79	93	GI:371492494
cPHDD118 <sup>(1)</sup>	183	506	Fumarato hidratasa ( <i>V. ordalii</i> )	95	98	GI:365541109
cPHDD123	198	504	ATPasa transporte ribosa RbsA ( <i>P. profundum</i> )	89	94	GI:54303226
cPHDD125 <sup>(1)</sup>	318	624	Manosil transferasa ( <i>V. cholerae</i> )	71	87	GI:153801524
cPHDD127	321	294	Fosfotransferasa ( <i>V. vulnificus</i> )	95	100	GI:319934572
cPHDD128	216	401	Proteína hipotética ( <i>Xanthomonas vesicatoria</i> )	38	62	GI:325917550
cPHDD130	432	1414	Regulador de virulencia BvgS ( <i>Aeromonas veronii</i> )	26	59	GI:330828889
cPHDD133	285	2204	Proteína hipotética ( <i>P. leiognathi</i> subsp. <i>mandapamensis</i> )	48	69	GI:330448675
cPHDD134	189	366	Proteína hipotética ( <i>Allochrochromatium vinosum</i> )	68	79	GI:288986966
cPHDD136	114	130	Proteína hipotética ( <i>Aliivibrio salmonicida</i> )	55	82	GI:209695107

Tabla IV.5: Cont.

Clon	Longitud (pb) (ORF)	Longitud (aa) (homólogo)	Homólogo	Identidad	Similitud	Nº acceso
cPHDD139	102	407	Peptidasa S8/S53 ( <i>Haliangium ochraceum</i> )	53	67	GI:262198481
cPHDD139	141	348	Permeasa EmrA ( <i>V. fischeri</i> )	50	68	GI:197337782
cPHDD140	396	531	Permeasa EmrB ( <i>V. orientalis</i> )	75	87	GI:261253498
cPHDD141 <sup>(1)</sup>	168	485	Proteína síntesis flagelo FlaK ( <i>P. profundum</i> )	67	84	GI:90411019
cPHDD143	270	573	Fosfolipasa C ( <i>Aeromonas hydrophila</i> )	48	66	GI:3746953
cPHDD145	330	862	Proteína de ensamblaje y síntesis del pili TraC ( <i>Shewanella baltica</i> )	65	80	GI:217975719
cPHDD150	180	187	Proteína hipotética ( <i>P. profundum</i> )	64	76	GI:54309791
cPHDD151	192	7691	Proteína hipotética citosólica ( <i>V. angustum</i> )	45	64	GI:90578281
cPHDD152	158	292	Transportador ABC ribosa ( <i>V. angustum</i> )	91	96	GI:90580508
cPHDD155	105	403	Proteína de biosíntesis de polisacárido capsular ( <i>Dickeya zeae</i> )	60	83	GI:251791123
cPHDD157	423	1078	Proteína hipotética ( <i>P. leiognathi</i> subsp. <i>mandapamensis</i> )	56	73	GI:330448676
cPHDD159	444	196	ATPasa segregación cromosómica ( <i>V. parahaemolyticus</i> )	78	89	GI:153838858
cPHDD165	468	263	Proteína hipotética ( <i>V. sinaloensis</i> )	33	58	GI:323497787
cPHDD169	117	2483	Hemaglutinina ( <i>V. alginolyticus</i> )	42	66	GI:269967801
cPHDD171	279	509	Transportador de ácido siálico ( <i>Fusobacterium mortiferum</i> )	67	86	GI:340750782
cPHDD173	270	848	Nitrito reductasa ( <i>Yersinia mollaretii</i> )	70	85	GI:238797277
cPHDD174	207	754	Óxido nítrico reductasa ( <i>Shewanella halifaxensis</i> )	70	79	GI:269101933
cPHDD176	480	418	Transportador de serina ( <i>P. profundum</i> )	83	94	GI:90412795
cPHDD183	207	371	Chaperona ( <i>V. angustum</i> )	63	74	GI:90579701
cPHDD184	225	233	Proteína hipotética ( <i>V. angustum</i> )	68	79	GI:90577936
cPHDD195 <sup>(1)</sup>	264	104	Proteína hipotética ( <i>V. mimicus</i> )	88	89	GI:258623728
cPHDD196 <sup>(1)</sup>	297	87	Proteína hipotética ( <i>Photobacterium</i> sp.)	35	55	GI:89074559
cPHDD198 <sup>(1)</sup>	438	182	Hidrogenasa ( <i>P. leiognathi</i> subsp. <i>mandapamensis</i> )	84	90	GI:330448644
cPHDD203	372	688	Proteína periplásmica ( No homólogos)			
cPHDD208	417	725	ATPasa secreción toxinas ( <i>P. leiognathi</i> subsp. <i>mandapamensis</i> )	72	86	GI:330447361
cPHDD212	354	372	Ligasa del antígeno O ( <i>P. profundum</i> )	48	73	GI:54307439
cPHDD213 <sup>(1)</sup>	282	379	$\beta$ -lactamasa ( <i>Yersinia enterocolitica</i> )	49	65	GI:123442853
cPHDD214	195	471	Proteína relacionada con síntesis flagelo FlhD ( <i>V. angustum</i> )	67	89	GI:90579920
cPHDD215 <sup>(1)</sup>	321	1054	Metilasa de sistema de restricción/modificación ( <i>V. mimicus</i> )	85	91	GI:262164055
cPHDD217	351	639	Diguanilato ciclasa/fosfodiesterasa ( <i>Shewanella putrefaciens</i> )	38	61	GI:146294680
cPHDD240	261	464	Proteína de sistema de secreción tipo VI ( <i>V. angustum</i> )	72	92	GI:90577917

(1) genes ausentes en la cepa tipo de *P. damsela* subsp. *damsela* ATCC 33539.



### 3. Identificación y caracterización de los genes determinantes de la actividad hemolítica en *P. damsela* subsp. *damsela*

El análisis de las secuencias específicas obtenidas de la hibridación sustractiva aplicada a la cepa RM-71 de la subsp. *damsela* mostró numerosos genes diferenciales con respecto a la subsp. *piscicida*. Estos genes diferenciales son potencialmente los responsables de las diferencias fenotípicas observadas entre ambas subespecies. Una de las características fenotípicas más claras en la mayoría de las cepas pertenecientes a la subsp. *damsela* es la capacidad de producir hemólisis sobre diferentes tipos de sangre tanto de peces como de mamíferos. En trabajos previos se ha establecido una clara relación entre la capacidad de causar hemólisis y la capacidad de causar enfermedad en peces y en ratón (Fouz *et al.*, 1992; Kreger, 1984). Dado el importante papel que parecen jugar las hemolisinas en la virulencia de esta bacteria, nos propusimos profundizar en los determinantes genéticos relacionados con esta actividad.

#### 3.1 Búsqueda del contexto genético de las diferentes hemolisinas

De entre todos los genes diferenciales obtenidos por hibridación sustractiva, hemos encontrado en la subsp. *damsela* un gen relacionado con la hemólisis: el gen que codifica la damselisina, una toxina cuya actividad hemolítica frente a eritrocitos de diversas especies de animales ya había sido demostrada (Kothary & Kreger, 1985).

Para poder conocer el contexto genómico de la damselisina, así como otros genes de interés que podrían jugar un papel en la virulencia de *P. damsela* subsp. *damsela* o estar involucrados en las diferencias fenotípicas observadas, construimos una genoteca en cósmidos de la cepa RM-71 de la subsp. *damsela* utilizada en la hibridación sustractiva. Como resultado obtuvimos 316 colonias de *E.*



**Figura. IV.6:** Clon de *E. coli* que contiene un cósmido con actividad  $\beta$ -hemolítica.

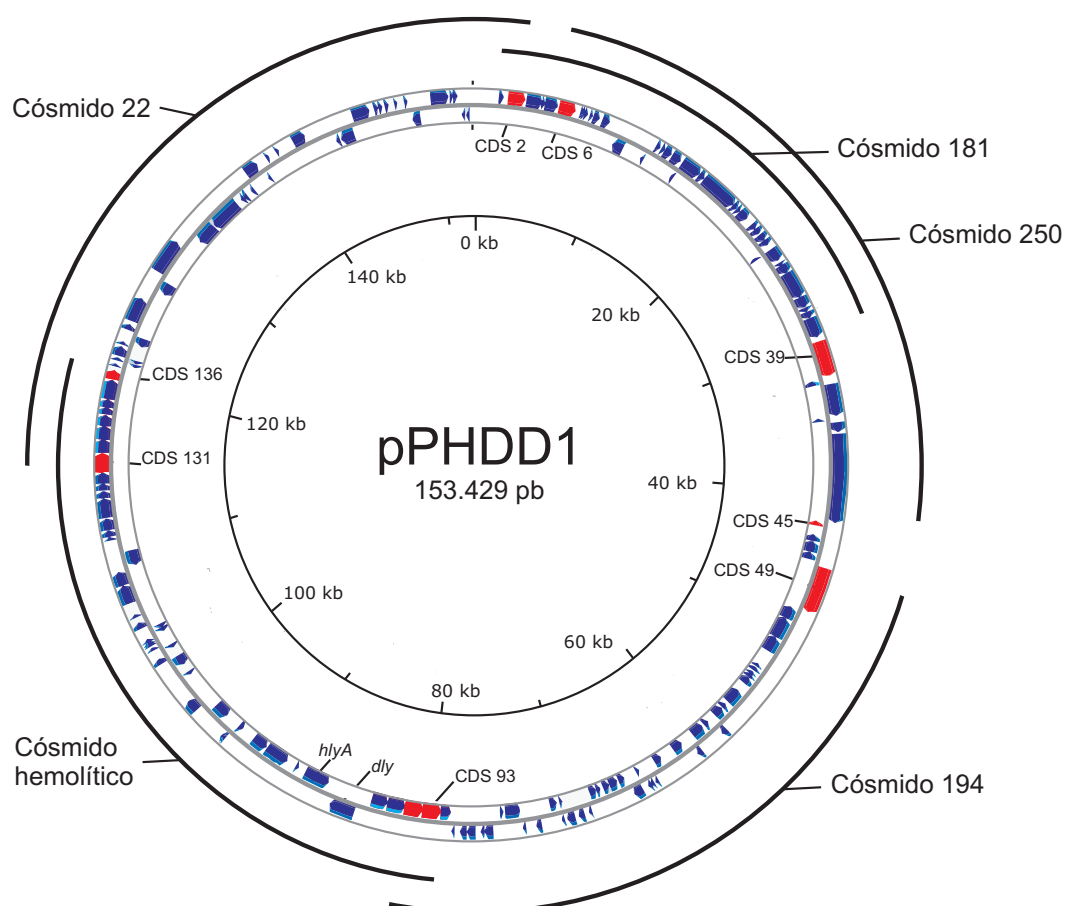
*coli* XL blue que contenían fragmentos de 20-40 kb del genoma de la cepa RM-71. Dado que el fenotipo hemolítico es fácilmente observable en placas de agar sangre, los 316 clones con cósmidos se sembraron individualmente en placas de agar sangre con el fin de encontrar algún cósmido que presentase actividad hemolítica. Pudimos observar dos fenotipos hemolíticos diferentes en algunos de los clones: un primer fenotipo hemolítico

muy tenue que se limitaba únicamente a la zona del agar situada debajo del crecimiento bacteriano, y un segundo fenotipo, observado en dos cósmidos, que consistió en un claro halo de tipo  $\beta$ -hemolítico (Figura IV.6). Dichos cósmidos se secuenciaron para esclarecer los genes responsables de producir los dos fenotipos hemolíticos diferentes. Pudimos comprobar que el cósmido que producía la hemólisis tenue contenía un gen que codifica una proteína con una identidad del 70% con una hemolisina de tipo III de 214 aminoácidos de *V. vulnificus* (GI:38489891). Se ha demostrado que esta hemolisina juega un papel en la virulencia de *V. vulnificus* para ratón (Chen *et al.*, 2004). Esta hemolisina será objeto de estudios más exhaustivos en este trabajo mediante su mutación y evaluación de la virulencia en peces (ver apartados 3 y 4).

La secuenciación de los dos cósmidos que producían el fenotipo de tipo  $\beta$ -hemolítico reveló la presencia de dos genes que codifican proteínas homólogas a hemolisinas; el primer gen codifica una proteína con un 100% de identidad con la damselsina. El segundo gen codifica una proteína que presenta valores de identidad de 68 a 94% con diversas hemolisinas de tipo HlyA, de la familia de las toxinas formadoras de poro, presentes en especies del género *Vibrio*. Además, adyacente a los dos genes de estas hemolisinas, hemos identificado los genes de un sistema de secreción que podría estar involucrado en su transporte al exterior celular.

La localización del gen de la damselsina era desconocida hasta el inicio del presente trabajo. En estudios previos se había descartado inicialmente una localización plasmídica y se había propuesto que podría estar codificada dentro de un profago (Cutter & Kreger, 1990). Para determinar la localización genómica del gen de la damselsina detectado, se buscaron dentro de la genoteca de cósmidos las secuencias adyacentes a los extremos de los cósmidos que contenían dicho gen. Asimismo, se buscaron cósmidos solapantes que contenían genes que podrían estar involucrados en virulencia o formar parte de un plásmido (genes *tra*, *par*, *rep*), dado que estudios anteriores sí habían sugerido una relación entre el contenido plasmídico, la actividad hemolítica (Takahashi *et al.*, 2008) y la virulencia de algunas cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* aisladas de rodaballo (Fouz *et al.*, 1992).





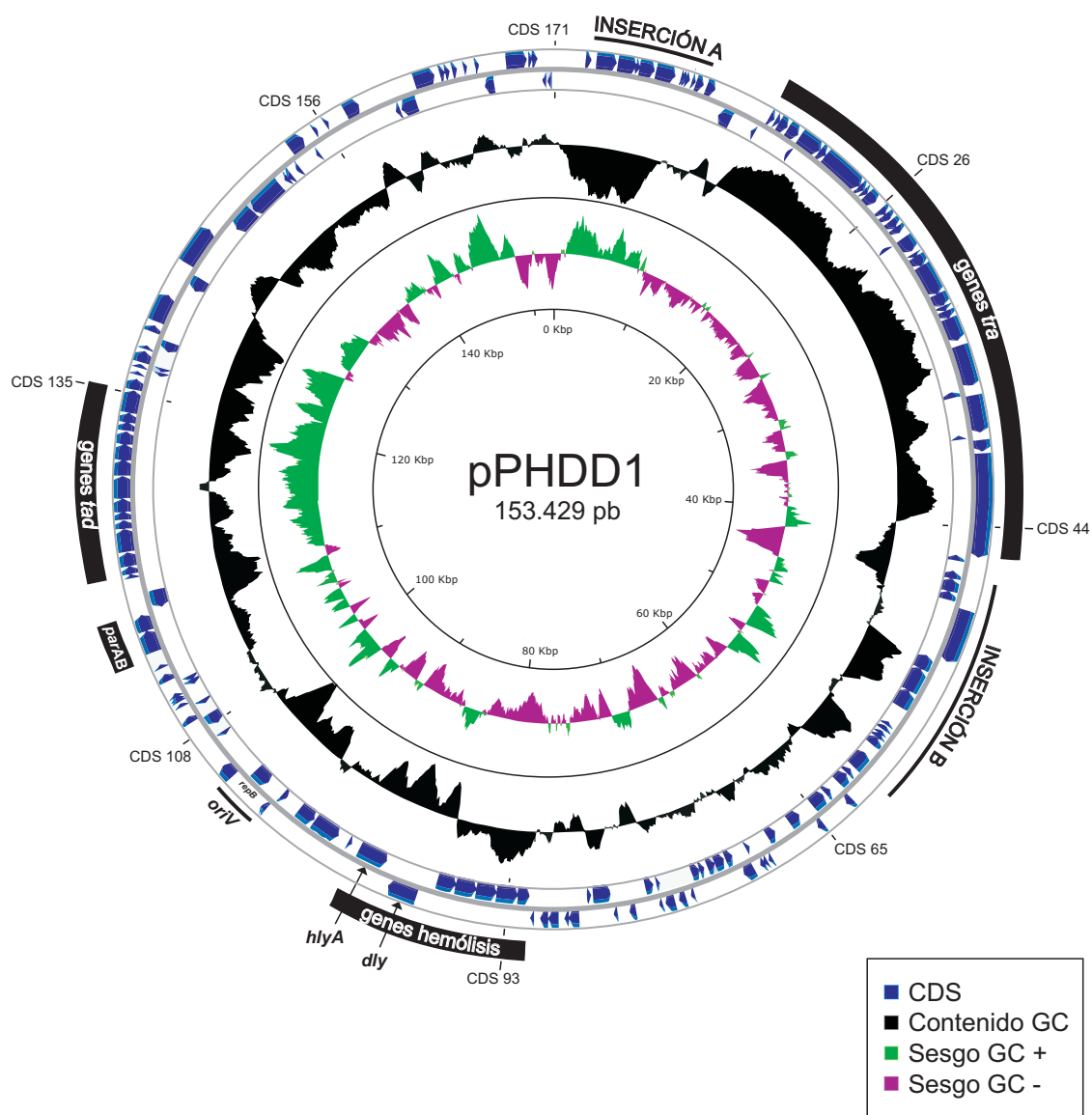
**Figura IV.7:** Localización de los diferentes cósmidos empleados en la secuenciación de pPHDD1. Desde fuera hacia adentro: se muestran en negro la posición de los cósmidos. Los dos primeros círculos representan los genes (en azul) ubicados en su hebra de ADN correspondiente y el círculo interno representa posiciones nucleotídicas en intervalos de 20 kb.

De esta forma logramos identificar cinco cósmidos cuyas secuencias solapantes demostraron corresponder a una molécula de ADN cerrada circularmente (Figura IV.7), lo que nos llevó al descubrimiento de un nuevo plásmido que contiene el gen de la damselisina y al cual bautizamos con el nombre de pPHDD1 (acrónimo que hace referencia a las iniciales de *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*).

### 3.2 Estructura genética de pPHDD1

El plásmido pPHDD1 se secuenció en su totalidad, resultando una secuencia completa formada por 153.429 pb. La anotación de los genes codificados en pPHDD1 se llevó a cabo a través del servidor RAST (Aziz *et al.*, 2008), identificándose un total de 171 ORFs (Tabla IV.6). La representación gráfica del plásmido se realizó mediante el servidor CGView (Grant & Stothard, 2008) (Figura IV.8). El análisis del contenido G+C, realizado con el programa Artemis (Carver *et al.*, 2005), reveló un valor medio del 37,9%, valor muy próximo al 40% mostrado por el genoma de la cepa de referencia de *P. damsela* subsp. *damsela*. Sin embargo, la distribución del contenido G+C a lo largo del plásmido mostró ser muy heterogénea, variando desde un 62,5% hasta un 11,6% (utilizando un rango o ventana de 120 pb). Este resultado sugiere que la secuencia génica y estructura de pPHDD1 es posiblemente el resultado de diversas reorganizaciones génicas y fenómenos de transferencia horizontal de diversas procedencias. pPHDD1 presenta una estructura genética modular, característica muy común en plásmidos de gran tamaño (Fernández-López *et al.*, 2006; Erauso *et al.*, 2011). Se pueden distinguir principalmente cinco módulos: un módulo de replicación (genes *rep*), un módulo de partición (genes *par*), un módulo de conjugación (genes *tra*), un módulo de adherencia (genes *tad*, *tight adherence*) y un módulo de hemólisis (genes *dly* y *hlyA*).

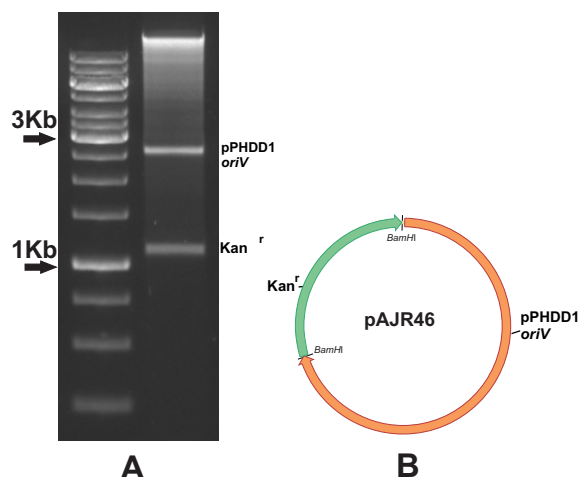
pPHDD1 presenta cinco secuencias de inserción (*IS*) completas y 20 parciales, cuatro de las cuales muestran homología con transposasas previamente descritas en *P. damsela* subsp. *piscicida* (Kim *et al.*, 2008). Muchas *IS* se encuentran muy próximas entre sí, incluso interrumpiendo sus propias secuencias, lo que sugiere que estos elementos dinámicos han experimentado una reciente transposición. Se han encontrado además aproximadamente 30 pseudogenes cuyo origen probablemente esté ligado a la introducción de mutaciones que alteraron la pauta de lectura provocando la aparición de un codón de parada, o también mediante la introducción de *IS* durante los eventos de transposición. A continuación, basándonos en la anotación obtenida por el servidor RAST, se describen en categorías funcionales aquellos genes cuyos homólogos han sido caracterizados.



**Figura IV.8:** Representación circular de pPHDD1. Desde fuera hacia adentro: los dos primeros círculos representan los genes (en azul) ubicados en su hebra de ADN correspondiente. Se muestran genes específicos en negrita y resaltados módulos funcionales, inserciones de ADN específicos de la cepa RM-71 y origen de replicación (*oriV*). El tercer y cuarto círculo representan la variación en el contenido GC y su sesgo respectivamente, y el círculo interno representa posiciones nucleotídicas en intervalos de 20 kb.

### 3.2.1 Genes relacionados con funciones replicativas y de partición

ORF105 y ORF50 muestran homología con RepB y RepA respectivamente, proteínas involucradas en la iniciación de la replicación plasmídica y control del número de copia. Normalmente estos genes se localizan muy próximos a los orígenes de replicación. La zona que comprende las secuencias adyacentes a *repB* muestra unos valores del 79 y 74% de contenido A+T. Además, se han encontrado adyacentes a *repB* repeticiones directas en tándem de 9 nucleótidos (TAAGATCTA) que podrían corresponderse con iterones. En base a estas deducciones, esta zona podría corresponderse con el origen de replicación de pPHDD1. Para corroborar esta idea, amplificamos por PCR una región de 2,6 kb que comprende el gen *repB* y las zonas adyacentes incluyendo la región de los iterones. Esta región se ligó al producto

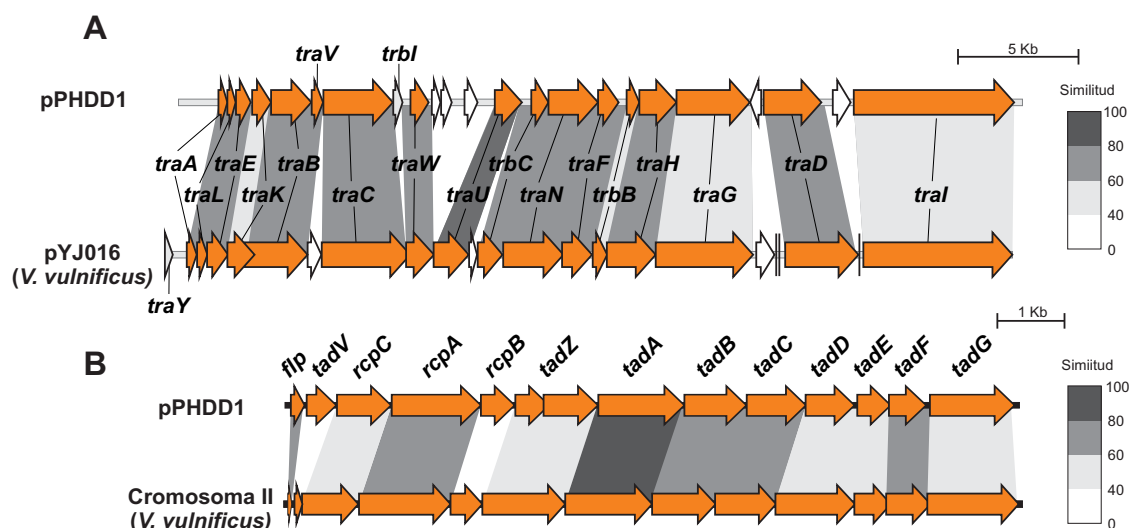


**Figura IV.9:** (A) *oriV*-pPHDD1 (pAJR46) digerido con *Bam*HI. (B) representación gráfica de pAJR46.

de PCR resultante de la amplificación del gen de resistencia a kanamicina del plásmido pKD4 (Datsenko & Wanner, 2000). Esta construcción (pAJR46) se transformó en *E. coli* y se obtuvieron colonias resistentes a kanamicina. Posteriormente, para confirmar que estas colonias contenían dicha construcción, se secuenció el ADN plasmídico y se digirió con *Bam*HI para liberar los fragmentos (Figura IV.9), demostrando así que la región que comprende el gen *repB* constituye el origen de replicación de pPHDD1. ORF63, 87, Y 89 mostraron homología con ATP<sub>asas</sub> de segregación cromosómica. ORF119-120 mostraron homología con proteínas tipo ParA/B de especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Estas proteínas están involucradas en procesos de división plasmídica. ORF141 mostró homología con resolvasas, recombinasas específicas de sitio involucradas en la liberación de la nueva copia plasmídica tras la replicación. ORF100 muestra homología con una ATP<sub>asa</sub> que probablemente juegue un papel en la reparación del ADN. No se han encontrado genes de tipo toxina/antitoxina ni otros sistemas de adición.

### **3.2.2 Sistemas de secreción (genes *tra* y genes *tad*)**

pPHDD1 contiene un sistema de genes *tra* (*orf14* a *orf44*) que codifican homólogos de proteínas pertenecientes a sistemas de secreción de tipo IV, lo que sugiere que pPHDD1 podría ser un plásmido conjugativo (trataremos este tema más adelante). El contenido G+C de esta región (46%) difiere de la media observada en la totalidad del plásmido (37,9%), lo que sugiere que distintas regiones del plásmido podrían proceder de diferentes orígenes. El sistema *tra* muestra parecido con sistemas *tra* descritos en plásmidos de otras bacterias marinas, como los plásmidos de *V. vulnificus* pYJ016 (Figura IV.10) y pC4602-1 de 48 kb y 56 kb respectivamente (Chen *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2008) y el plásmido de 80 kb pPBPR1 de *Photobacterium profundum* (Vezzi *et al.*, 2005). El plásmido pPHDD1 contiene un sistema completo de genes *tad* (*tight adherence*) (*orf122* a *orf135*) que forman una compleja maquinaria macromolecular involucrada en el ensamblaje y en la síntesis de un pili adhesivo perteneciente a la subfamilia Flp de tipo IVb, que también se halla codificado dentro de este operón. Estos genes fueron inicialmente descritos en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* como mediadores de un fenotipo de fuerte adherencia, y este sistema se halla involucrado en procesos de adherencia a superficies abióticas o a células hospedadoras (Tomich *et al.*, 2007). Este operón muestra una gran propensión a ser adquirido por transferencia horizontal, siendo conocido como una isla de colonización implicada en la patogénesis de diversas especies bacterianas como *A. actinomycetemcomitans*, *Haemophilus ducreyi*, *Pasteurella multocida* y *Yersinia ruckeri* (Clock *et al.*, 2008). Dentro del género *Vibrio*, *V. fischeri* contiene dos operones de genes *tad*, uno en cada cromosoma y *V. vulnificus* YJ016 contiene tres, uno en el cromosoma II y dos en el cromosoma I. La organización génica de los genes *tad* de pPHDD1 muestra una clara sintenia con los genes *tad* del locus I de *V. vulnificus* (Figura IV.10) y con los genes *tad* de *A. actinomycetemcomitans*.



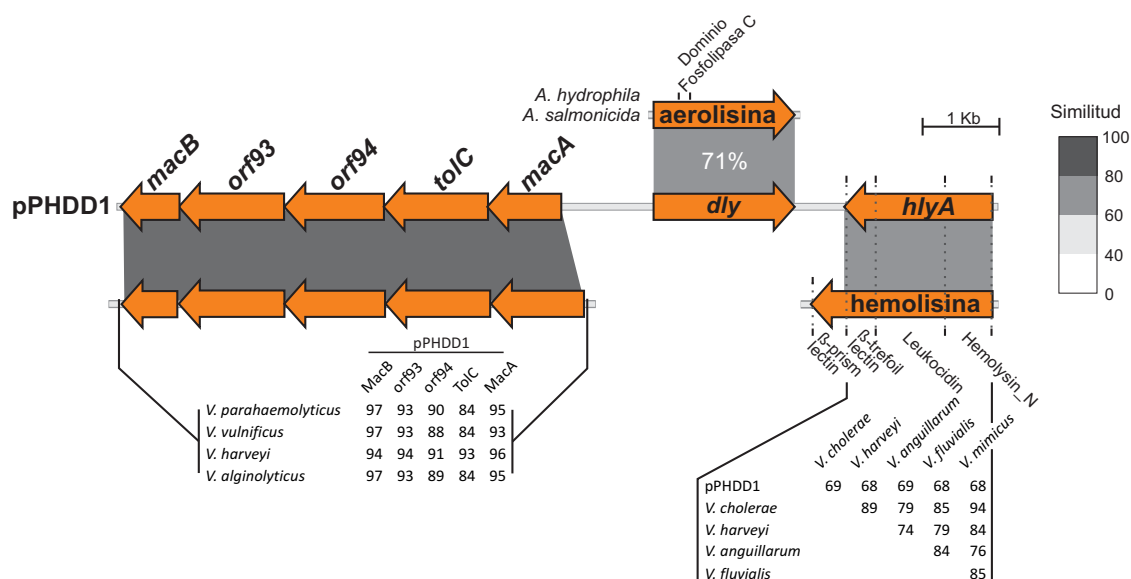
**Figura IV.10:** Mapa físico de los operones *tra* (A) y *tad* (B) de pPHDD1 comparados con sus homólogos más próximos de otras bacterias marinas. Aparecen en blanco aquellos genes *tra* sin homólogo determinado. El porcentaje de similitud entre proteínas se representa bajo una escala de grises en concordancia con las tonalidades representadas en la parte derecha de las figuras.

### 3.2.3 Genes relacionados con actividades hemolíticas

Uno de los aspectos más notables de pPHDD1 es la presencia de dos genes hemolíticos, *orf97* y *98*, que codifican respectivamente la damselisina (Dly) y una segunda hemolisina, hasta el momento no descrita en esta especie, y que muestra homología con HlyA, perteneciente a la familia de las toxinas formadoras de poro. Aunque hace décadas que se conoce la actividad de la Dly, la secuencia del gen que la codifica (*dly*) no ha sido completada hasta ahora. La secuencia de aminoácidos de Dly muestra sólo dos homólogos caracterizados, una fosfolipasa C de *Aeromonas hydrophila* (57% identidad) (Merino *et al.*, 1999) y una hemolisina de *A. salmonicida* (56% identidad) (Hirono & Aoki, 1993) (Figura IV.11). Una búsqueda en la base de datos Pfam mostró la ausencia de dominios conservados dentro de la secuencia de la Dly.

El gen que codifica la HlyA se encuentra inmediatamente a continuación y situado en la hebra opuesta al gen *dly* (Figura IV.11). HlyA muestra una elevada identidad (64-94%) con otras HlyAs descritas con actividad hemolítica en diferentes especies pertenecientes a los géneros *Vibrio* y *Aeromonas* (Figura IV.11). Las HlyAs se caracterizan por ensamblarse en las membranas de una amplia variedad de células eucariotas formando heptámeros y dando lugar a la formación de un poro que provoca una alteración en la permeabilidad de la membrana celular (He & Olson, 2009). Una

búsqueda en la base de datos Pfam mostró la presencia de tres dominios conservados dentro de la HlyA codificada en pPHDD1 que son compartidos con la HlyA de *V. cholerae* (He & Olson, 2009; Olson & Gouaux, 2003; Yamamoto *et al.*, 1990b) y otras especies del género *Vibrio*, aunque algunas de estas HlyAs contienen un cuarto dominio próximo a sus extremos C-terminal que está ausente en la HlyA de *P. damsela* subsp. *damsela* (Figura IV.11). Tanto la damselisina como la HlyA serán objeto de estudios más exhaustivos en apartados posteriores. Precediendo al gen *dly*, en la hebra contraria se encuentran cinco genes (*orf92-96*) que podrían formar parte del sistema de secreción de Dly y HlyA. Este sistema incluye una ATP<sub>asa</sub> de membrana interna homóloga a MacB (Lin *et al.*, 2009a), dos permeasas de unión al ATP con homólogos descritos en especies del género *Vibrio*, un gen que codifica una proteína de fusión a membrana (Lin *et al.*, 2009a), y por último TolC, una proteína necesaria para la secreción de diversos compuestos, incluidas citolisinas y hemolisinas. En *E. coli* TolC se requiere específicamente para la secreción de HlyA (Wandersman & Delepelaire, 1990).



**Figura IV.11:** Mapa físico del clúster de hemólisis codificado en el plásmido pPHDD1. El porcentaje de similitud con los homólogos más próximos de otras bacterias marinas se representa mediante matrices de datos o, en el caso de la damselisina, en la región sombreada.

### **3.2.4 Genes relacionados con virulencia**

Además de los genes relacionados con actividades hemolíticas hemos encontrado otros genes que podrían estar involucrados en la virulencia. Próximo al operón *tad* se encuentra el gen *ompA* (*orf136*), el cual codifica una proteína integral de membrana externa. En cepas uropatogénicas de *E. coli* (UPEC), OmpA es un factor de virulencia clave después de la invasión epitelial ya que facilita la maduración y persistencia bacteriana dentro de las células (Nicholson *et al.*, 2009). ORF157 mostró homología con OmpU, una porina que juega un papel en el control de la permeabilidad de la membrana de bacterias Gram negativas. OmpU confiere resistencia a deoxicolato, uno de los componentes mayoritarios de la bilis (Pagel *et al.*, 2007), y en *V. splendidus* OmpU está involucrada en resistencia frente a antimicrobianos, adherencia y virulencia (Duperthuy *et al.*, 2010). La *orf148* muestra homología con *vep07*, un gen que codifica una toxina de la familia de las RTX y cuyo papel en la virulencia de *V. vulnificus* para anguila ha sido claramente establecido (Lee *et al.*, 2008).

### **3.2.5 Genes relacionados con procesos reguladores o metabólicos**

Las *orf83* y *orf91* codifican dos proteínas tipo histonas de unión al ADN, que actúan en la topología del ADN y pertenecen a la familia de las H-NS. En *E. coli* actúan controlando la expresión de unos 200 genes en respuesta a cambios medioambientales como la presión osmótica, el pH y la temperatura (Arold *et al.*, 2010). ORF106 muestra homología con reguladores transcripcionales de tipo AraC. ORF101 es homóloga a proteínas quimiotácticas aceptadoras de metilos, las cuales actúan como sensores en procesos de búsqueda de metabolitos (taxis energética) (Schweinitzer & Josenhans, 2010). ORF62, 65, 147 y 166 guardan relación con rutas metabólicas generales. ORF145 y 167 son proteínas de membrana sin una clara función adscrita. ORF160 y 85 guardan relación con procesos de control de división celular y ORF149 muestra homología con receptores de membrana externa dependientes de TonB implicados en la captación de hierro, probablemente a partir de macromoléculas como transferrina o hemoglobina.



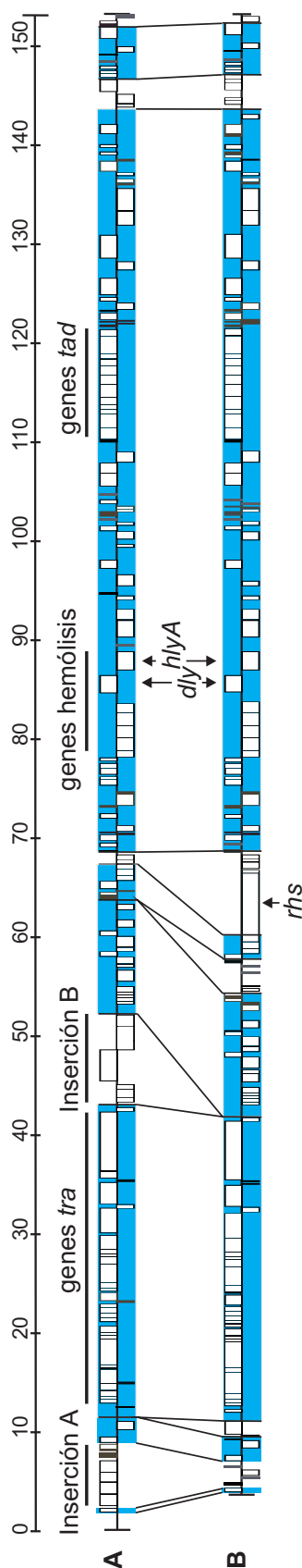
### **3.2.6 Genes exclusivos de la cepa RM-71**

Mientras el presente trabajo se estaba desarrollando, y mientras abordábamos la secuenciación de los cósmidos que contenían la estructura completa del plásmido pPHDD1, otros autores depositaron en las bases de datos públicas, en forma de contigs separados, el genoma completo de la cepa tipo de *P. damsela* subsp. *damsela* ATCC 33539. Un contig de 149.928 pb (contig 55, Nº de acceso en GenBank: NZ\_ADBS01000004), mostró un alto grado de sintenia con la secuencia de pPHDD1 que habíamos obtenido en la cepa RM-71 (Figura IV.12). Para confirmar que este contig de la base de datos constituía una molécula circular *in vivo*, basándonos en su secuencia, diseñamos en sus extremos dos cebadores en dirección opuesta. El resultado de esta PCR nos confirmó que también esta secuencia correspondía a un plásmido en la cepa ATCC 33539. Aunque la similitud entre ambas secuencias es muy alta, pudimos encontrar diferencias entre ambas, teniendo pPHDD1 3.501 pb más. El gen *rhs* presente en el contig 55, se halla prácticamente deletado en la secuencia de pPHDD1, en cambio, pPHDD1 contiene dos inserciones de ADN de 10 kb y 6,6 kb respectivamente que se encuentran ausentes en el contig 55.

La inserción de 6,6 kb (Inserción A) (*orf1-10*) muestra un contenido G+C más bajo que la media del plásmido y comprende diez ORFs truncadas que corresponden a pseudogenes. ORF2 muestra homología con glicosil transferasas, enzimas que desempeñan un papel muy importante ya que intervienen en la síntesis de glicoproteínas, glicolípidos, oligosacáridos, y polisacáridos de la pared o de la membrana celular en Bacterias, Hongos, Plantas y Crustáceos (Keenleyside *et al.*, 2001). *orf3/4* y *orf5/6* codifican homólogos truncados de CvaA y CvaB. Estas dos proteínas forman parte de un sistema de exportación involucrado en secretar una pequeña toxina peptídica antimicrobiana de 9 KDa denominada colicina V (ColV), la cual suele ir codificada junto a su antitoxina en una variedad de plásmidos de bajo número de copia dentro de la familia *Enterobacteriaceae* (Hwang *et al.*, 1997).

La inserción de 10 kb (Inserción B) muestra un contenido G+C variable a lo largo de su secuencia. Dicha región comprende 9 ORFs, (*orf47-55*), tres ORFs no muestran homólogos conocidos, mientras que dos ORFs muestran homologías con metiltransferasas relacionadas con sistemas de restricción-modificación, sistemas que

cortan ADN exógeno (procedente de fagos, por ejemplo) y protegen el ADN celular metilándolo (Enikeeva *et al.*, 2010). ORF50 muestra homología con RepA, una replicasa plasmídica, cuya función parece ser prescindible para la replicación del plásmido, dado que en la cepa ATCC 33539 está ausente. ORF51-52 muestran homologías con integrasas de *Shewanella*. Las integrasas son proteínas involucradas en recombinaciones de ADN específicas entre dos secuencias de reconocimiento y normalmente están relacionadas con eventos de integración y escisión de bacteriófagos, transposición de transposones conjugativos y terminación de la replicación cromosómica (Schubert *et al.*, 2004).



**Figura IV.12:** Conservación de la sintenia entre pPHDD1 de la cepa RM-71 (A) y el contig 55 de la cepa ATCC 33539 (Nº acceso GenBank NZ\_ADBS01000004) (B). Los bloques conservados se muestran en color gris. Las líneas verticales y diagonales conectan regiones de sintenia que se encuentran separadas por inserciones de ADN específicas de una de las dos moléculas. Se resaltan las dos inserciones principales (inserción A y B), nombres de genes (*rhs*, *dly*, y *hlyA*) y los módulos funcionales (operones *tra*, *tad* y hemólisis).

**Tabla IV.6:** Relación de proteínas homólogas a los productos de los genes codificados en pHDD1. (1):CDSs correspondientes a las inserciones de ADN exclusivas de la cepa RM-71. (2): pseudogenes.

CDS	Inicio-final	Longitud (pb)	Homólogo	Nº acceso	Identidad	Similitud
CDS_1 <sup>(1)</sup>	1846-2196	351	Proteína hipotética ( <i>Providencia stuartii</i> )	GI:183598429	39%	61%
CDS_2 <sup>(1)</sup>	2463-3629	1167	Glucosil transferasa ( <i>Yersinia frederiksenii</i> )	GI:238789003	38%	58%
CDS_3 <sup>(1,2)</sup>	3681-4775	1095	Secreción de colicinas tipo V CvaA ( <i>Enterobacter cancerogenus</i> )	GI:261339937	40%	63%
CDS_4 <sup>(1,2)</sup>	4756-4947	192	Secreción de colicinas tipo V CvaA ( <i>Enterobacter cancerogenus</i> )	GI:261339937	49%	68%
CDS_5 <sup>(1,2)</sup>	4941-5828	888	Secreción de microcinas MceG ( <i>Klebsiella pneumoniae</i> )	GI:15808046	48%	71%
CDS_6 <sup>(1,2)</sup>	5896-7035	1140	Secreción de microcinas MceG ( <i>Klebsiella pneumoniae</i> )	GI:15808046	52%	76%
CDS_7 <sup>(1)</sup>	7410-7532	123	Sin homologías			
CDS_8 <sup>(1,2)</sup>	7537-7671	135	Transposasa OrfA ( <i>V. cholerae</i> )	GI:220897842	93%	93%
CDS_9 <sup>(1,2)</sup>	7723-7818	96	Transposasa OrfA ( <i>V. cholerae</i> )	GI:220897842	89%	92%
CDS_10 <sup>(1,2)</sup>	8036-8224	189	Transposasa OrfB ( <i>V. cholerae</i> )	GI:229522512	75%	83%
CDS_11 <sup>(1,2)</sup>	8256-8714	459	Transposasa OrfB ( <i>V. cholerae</i> )	GI:229522512	82%	88%
CDS_12 <sup>(1)</sup>	8889-9428	540	Sin homologías			
CDS_13	10153-10965c	813	Proteína hipotética ( <i>Photobacterium</i> sp.)	GI:89076106	51%	71%
CDS_14	12378-12518c	141	Sin homologías			
CDS_15	12855-13181	327	TraA ( <i>V. vulnificus</i> )	GI:37595825	49%	60%
CDS_16	13244-13489	246	TraL ( <i>V. vulnificus</i> )	GI:37595826	49%	67%
CDS_17	13502-14056	555	TraE ( <i>V. vulnificus</i> )	GI:153971618	46%	63%
CDS_18	14100-14801	702	TraK ( <i>Shewanella baltica</i> )	GI:151367556	32%	50%
CDS_19	14798-14977c	180	Sin homologías			
CDS_20	14922-16295	1374	TraB ( <i>V. vulnificus</i> )	GI:153971620	41%	57%
CDS_21	16305-16721	417	TraV ( <i>Shewanella baltica</i> )	GI:152998540	32%	51%
CDS_22	16730-19315	2586	TraC ( <i>P. profundum</i> )	GI:47104033	53%	71%
CDS_23	19316-19663	348	TrbI ( <i>Serratia odorifera</i> )	GI:293397456	27%	50%
CDS_24	19667-19948	282	Sin homologías			
CDS_25	19952-20641	690	TraW ( <i>P. profundum</i> )	GI:47104035	47%	65%
CDS_26	21087-21482	396	Proteína hipotética ( <i>A. hydrophila</i> )	GI:242348001	32%	52%
CDS_27	21488-21919	432	Sin homologías			
CDS_28	21953-22441	489	Proteína hipotética ( <i>V. metschnikovii</i> )	GI:23452391	59%	71%
CDS_29	22434-22844	411	Sin homologías			
CDS_30	23056-23178c	123	Sin homologías			
CDS_31	23168-24085	918	TraU ( <i>V. vulnificus</i> )	GI:153971624	71%	86%
CDS_32	24247-24462	216	Sin homologías			
CDS_33	24443-25072	630	TrbC ( <i>P. profundum</i> )	GI:47104037	42%	62%
CDS_34	25069-26901	1833	TraN ( <i>P. profundum</i> )	GI:47104038	41%	58%
CDS_35	26898-27662	765	TraF ( <i>Shewanella baltica</i> )	GI:217501075	50%	66%
CDS_36	27665-27958	294	Proteína hipotética ( <i>V. fischeri</i> )	GI:197336557	43%	63%
CDS_37	27970-28428	459	TrbB ( <i>Shewanella baltica</i> )	GI:151367545	42%	58%
CDS_38	28425-29798	1374	TraH ( <i>Shewanella baltica</i> )	GI:217975600	44%	65%
CDS_39	29801-32512	2430	TraG ( <i>P. profundum</i> )	GI:47104041	36%	56%
CDS_40	32529-32927c	399	Proteína hipotética ( <i>P. profundum</i> )	GI:47104042	27%	50%
CDS_41	33018-35168	2151	TraD ( <i>P. profundum</i> )	GI:47104044	49%	67%

Tabla IV.6: cont.

CDS	Inicio-final	Longitud (pb)	Homólogo	Nº acceso	Identidad	Similitud
CDS_42	35244-35387c	144	Sin homologías			
CDS_43	35583-36251	669	Proteína hipotética ( <i>Sphingomonas</i> sp.)	GI:94496412	31%	50%
CDS_44	36356-42298	5943	TraI ( <i>P. profundum</i> )	GI:47104047	44%	62%
CDS_45	42335-42697c	363	Proteína hipotética ( <i>Shewanella baltica</i> )	GI:152998525	36%	51%
CDS_46 <sup>(1)</sup>	43311-43784c	474	Proteína hipotética ( <i>V. caribbenthicus</i> )	GI:309368110	30%	46%
CDS_47 <sup>(1)</sup>	43781-44560c	780	Proteína con motivo PAAR ( <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Phaseolicola</i> )	GI:71734756	32%	49%
CDS_48 <sup>(1)</sup>	44564-45070c	507	Proteína con motivo PAAR ( <i>Acinetobacter baumannii</i> )	GI:213156264	32%	52%
CDS_49 <sup>(1)</sup>	45360-48512	3153	Proteína hipotética ( <i>V. mimicus</i> )	GI:262164055	75%	86%
CDS_50 <sup>(1)</sup>	48583-49497c	915	RepA ( <i>V. fluvialis</i> )	GI:219372122	57%	72%
CDS_51 <sup>(1)</sup>	49487-50986c	1500	Integrasa de fago ( <i>Shewanella baltica</i> )	GI:126173817	38%	57%
CDS_52 <sup>(1)</sup>	50983-52104c	1122	Integrasa de fago ( <i>Shewanella baltica</i> )	GI:126175915	36%	54%
CDS_53 <sup>(1)</sup>	53210-53428c	219	Sin homologías			
CDS_54 <sup>(1)</sup>	53471-53779c	309	Sistema restricción-modificación, subunidad metiltransferasa ( <i>V. harveyi</i> )	GI:156936685	46%	66%
CDS_55 <sup>(1)</sup>	53851-54087c	237	Sin homologías			
CDS_56	54048-54356c	309	Sin homologías			
CDS_57	54353-54898c	546	Sin homologías			
CDS_58	55490-56614c	1125	Transposasa ( <i>V. parahaemolyticus</i> )	GI:308107294	91%	96%
CDS_59 <sup>(2)</sup>	56831-57172c	342	Transposasa GipA ( <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> )	GI:77361950	79%	91%
CDS_60 <sup>(2)</sup>	57202-57927c	726	Transposasa GipA ( <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> )	GI:77361950	71%	81%
CDS_61	58009-58428	420	Transposasa ( <i>Streptomyces violaceusniger</i> )	GI:307325532	67%	78%
CDS_62	58563-58937c	375	Lactoilglutathion liasa ( <i>V. vulnificus</i> )	GI:27365799	67%	86%
CDS_63	59045-59989c	945	ATP <sub>asa</sub> , segregación cromosómica ( <i>Pseudoalteromonas tunicata</i> )	GI:88859986	28%	54%
CDS_64	60147-60533	387	Proteína de unión al ADN tipo H-NS ( <i>Yersinia intermedia</i> )	GI:238794918	57%	73%
CDS_65	60937-61704c	768	Acetato/propionato quinasa ( <i>Photobacterium</i> sp.)	GI:89071954	68%	84%
CDS_66	62672-63268c	597	Proteína hipotética ( <i>P. profundum</i> )	GI:47104056	45%	70%
CDS_67 <sup>(2)</sup>	63706-63858	153	Transposasa, subunidad A ( <i>V. cholerae</i> )	GI:229519826	92%	94%
CDS_68 <sup>(2)</sup>	63981-64187	207	Transposasa, subunidad B ( <i>V. cholerae</i> )	GI:153801438	77%	84%
CDS_69 <sup>(2)</sup>	64191-64439	249	Transposasa, subunidad B ( <i>V. cholerae</i> )	GI:153801438	96%	98%
CDS_70	64514-64684c	171	Sin homologías			
CDS_71	64840-65526	687	Transposasa ( <i>P. damsela</i> )	GI:21307617	83%	92%
CDS_72	65621-66100c	480	Proteína hipotética ( <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> )	GI:270492531	44%	58%
CDS_73	66161-66799c	639	Proteína hipotética ( <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> )	GI:270493356	42%	60%
CDS_74 <sup>1</sup>	66807-67274c	468	Nucleasa ( <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> )	GI:270493357	65%	76%
CDS_75	67457-67771c	315	Proteína hipotética ( <i>Shewanella</i> sp.)	GI:114045646	29%	59%
CDS_76	67771-68286c	516	Proteína hipotética ( <i>Burkholderia xenovorans</i> )	GI:91779922	52%	64%
CDS_77 <sup>(2)</sup>	68597-68689	93	Transposasa ( <i>V. cholerae</i> )	GI:229520808	65%	65%
CDS_78 <sup>(2)</sup>	69054-69482	429	Transposasa ( <i>V. cholerae</i> )	GI:229522512	72%	84%

**Tabla IV.6:** cont.

CDS	Inicio-final	Longitud (pb)	Homólogo	Nº acceso	Identidad	Similitud
CDS_79 <sup>(2)</sup>	69706-70266	561	Transposasa ( <i>Marinomonas</i> sp.)	GI:152995768	36%	63%
CDS_80	70315-70434c	120	Sin homologías			
CDS_81 <sup>(2)</sup>	70454-70576	123	Transposasa ( <i>Marinomonas</i> sp.)	GI:152995768	76%	86%
CDS_82	70665-71177c	513	Proteína hipotética ( <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> )	GI:200386855	51%	66%
CDS_83	71986-72369	384	Proteína de unión al ADN tipo H-NS ( <i>Yersinia ruckeri</i> )	GI:238754927	60%	73%
CDS_84	73084-73224	141	Sin homologías			
CDS_85	73221-74324c	1104	Proteína de filamentación inducida por AMP <sub>c</sub> ( <i>Vibrio fischeri</i> )	GI:197334864	82%	89%
CDS_86 <sup>(2)</sup>	74447-74659c	213	Resolvasa ( <i>Photobacterium</i> sp.)	GI:89076592	82%	89%
CDS_87	75232-75831	600	ATP <sub>asa</sub> , segregación cromosómica ( <i>V. parahaemolyticus</i> )	GI:153838858	69%	80%
CDS_88	75824-76072	249	Proteína hipotética ( <i>V. parahaemolyticus</i> )	GI:153838867	66%	80%
CDS_89	76409-77002	594	ATP <sub>asa</sub> , segregación cromosómica ( <i>V. parahaemolyticus</i> )	GI:153838858	69%	78%
CDS_90	76995-77459	465	Proteína hipotética ( <i>V. parahaemolyticus</i> )	GI:153838867	70%	84%
CDS_91 <sup>(2)</sup>	77810-78007	198	Proteína de unión al ADN tipo H-NS ( <i>Photobacterium</i> sp.)	GI:89075748	52%	71%
CDS_92	78114-78833c	720	MacB ( <i>V. parahaemolyticus</i> )	GI:153837795	93%	97%
CDS_93	78826-80109c	1284	Transportador péptidos antimicrobianos, permeasa ( <i>V. harveyi</i> )	GI:153833364	88%	93%
CDS_94	80112-81326c	1215	Transportador péptidos antimicrobianos, permeasa ( <i>V. harveyi</i> )	GI:153833362	85%	92%
CDS_95	81323-82594c	1272	TolC ( <i>V. harveyi</i> )	GI:153833383	80%	87%
CDS_96	82587-83723c	903	Proteína de fusión a membrana MacA ( <i>V. harveyi</i> )	GI:148870368	90%	95%
CDS_97	84614-86335	1722	Damselina ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> )	GI:295428 gb	99%	99%
CDS_98	86938-88749c	1812	Vha1 ( <i>V. anguillarum</i> )	GI:197313281	49%	69%
CDS_99	89344-89472c	129	Sin homologías			
CDS_100	90213-91919c	1707	ATP <sub>asa</sub> relacionada con reparación de ADN ( <i>Haemophilus parasuis</i> )	GI:219870560	43%	66%
CDS_101	91974-93044c	1071	Proteína quimiotáctica aceptadora de metilos ( <i>A. actinomycetemcomitans</i> )	GI:293390407	55%	74%
CDS_102	94035-94397c	363	Sin homologías			
CDS_103	94591-94713	123	Sin homologías			
CDS_104	94713-94832	120	Sin homologías			
CDS_105	95452-96540c	1089	RepB ( <i>V. furnissii</i> )	GI:260771516	77%	88%
CDS_106	97188-98030	843	Proteína hipotética ( <i>Paracoccus denitrificans</i> )	GI:119384446	24%	45%
CDS_107	99302-99592c	291	Transposasa ( <i>V. angustum</i> )	GI:90580688	66%	76%
CDS_108	100159-100908c	750	Transposasa ( <i>V. angustum</i> )	GI:90580679	85%	88%
CDS_109	101028-101447	420	Transposasa ( <i>V. angustum</i> )	GI:90580673	90%	95%
CDS_110	101550-101861c	312	Proteína hipotética ( <i>Spirosoma linguale</i> )	GI:284038125	56%	71%
CDS_111	102118-102252	135	Sin homologías			
CDS_112	102446-102565	120	Sin homologías			
CDS_113	102562-102714	153	Sin homologías			

Tabla IV.6: cont.

CDS	Inicio-final	Longitud (pb)	Homólogo	Nº acceso	Identidad	Similitud
CDS_114	102728-102898	171	Sin homologías			
CDS_115 <sup>(2)</sup>	102886-103209c	324	Transposasa ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> )	GI:118614776	76%	88%
CDS_116	103178-103468c	291	Transposasa ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> )	GI:288551482	82%	90%
CDS_117	103730-104173	444	Proteína familia RDD ( <i>V. harveyi</i> )	GI:153832271	38%	57%
CDS_118 <sup>(2)</sup>	104571-104735	165	Transposasa ( <i>Marinobacter aquaeolei</i> )	GI:120536895	53%	81%
CDS_119	105563-106825	1263	ParA ( <i>Salmonella enterica</i> )	GI:145848950	51%	69%
CDS_120	106827-107786	960	ParB ( <i>Salmonella typhi</i> )	GI:10957209	38%	62%
CDS_121	107906-108985c	1080	Proteína hipotética ( <i>Shewanella piezotolerans</i> )	GI:212637198	24%	46%
CDS_122	109953-110162	210	Proteína Flp de ensamblaje del pili ( <i>V. parahaemolyticus</i> )	GI:254506074	63%	73%
CDS_123	110189-110629	441	TadV ( <i>Aliivibrio salmonicida</i> )	GI:209809168	53%	70%
CDS_124	110639-111442	804	Proteína de ensamblaje del pili RcpC/CpaB ( <i>V. fischeri</i> )	GI:197337610	46%	69%
CDS_125	111463-112779	1317	Secretina RcpA/CpaC ( <i>V. fischeri</i> )	GI:197337022	68%	84%
CDS_126	112776-113279	504	Hipotética lipoproteína ( <i>V. fischeri</i> )	GI:197337697	37%	60%
CDS_127 <sup>(2)</sup>	113285-113788	504	TadZ ( <i>Aliivibrio salmonicida</i> )	GI:209809172	50%	72%
CDS_128 <sup>(2)</sup>	113746-114513	768	TadZ ( <i>Aliivibrio salmonicida</i> )	GI:209809172	47%	70%
CDS_129	114517-115797	1281	TadA ( <i>V. fischeri</i> )	GI:197337406	77%	92%
CDS_130	115797-116717	921	TadB ( <i>V. fischeri</i> )	GI:197337544	63%	78%
CDS_131	116690-117601	912	TadC ( <i>V. fischeri</i> )	GI:197337342	58%	78%
CDS_132	117594-118322	729	TadD ( <i>V. coralliilyticus</i> )	GI:260775647	37%	56%
CDS_133	118364-118861	498	TadE ( <i>V. fischeri</i> )	GI:59713410	54%	77%
CDS_134	118833-119384	552	TadF ( <i>V. fischeri</i> )	GI:59713411	58%	79%
CDS_135	119390-120700	1311	TadG ( <i>V. fischeri</i> )	GI:59713412	51%	68%
CDS_136	120729-121361	633	OmpA ( <i>V. fischeri</i> )	GI:197336986	40%	61%
CDS_137	121621-121803	183	Sin homologías			
CDS_138	121902-122024c	123	Sin homologías			
CDS_139	122072-122185	114	Sin homologías			
CDS_140	122182-122295c	114	Sin homologías			
CDS_141	122337-123014	678	Resolvasa ( <i>Shewanella putrefaciens</i> )	GI:124507897	83%	92%
CDS_142	123168-123302	135	Sin homologías			
CDS_143	123356-123982c	627	Proteína familia LcmR ( <i>Listeria monocytogenes</i> )	GI:254932545	45%	58%
CDS_144	124174-124569	396	Proteína hipotética ( <i>Shewanella sediminis</i> )	GI:157374526	57%	73%
CDS_145	124803-126479	1677	Proteína hipotética de membrana ( <i>V. fischeri</i> )	GI:197337021	34%	59%
CDS_146	127367-128203c	837	Proteína familia YdiA ( <i>V. harveyi</i> )	GI:153832204	89%	95%
CDS_147	128531-130891	2361	Fosfoenolpiruvato sintasa ( <i>V. harveyi</i> )	GI:156977729	92%	96%
CDS_148	131834-133297c	1464	Proteína homóloga a vep07 ( <i>V. vulnificus</i> )	GI:222430903	35%	52%
CDS_149	133321-135576c	2256	Proteína de unión a transferrina ( <i>V. vulnificus</i> )	GI:153971508	59%	75%
CDS_150 <sup>(2)</sup>	135969-136175c	207	Transposasa ( <i>Shewanella piezotolerans</i> )	GI:212634999	82%	88%
CDS_151 <sup>(2)</sup>	136172-136495c	324	Transposasa OrfB ( <i>V. furnissii</i> )	GI:260771527	71%	81%
CDS_152	136855-137124c	270	Transposasa OrfA ( <i>V. cholerae</i> )	GI:121726096	75%	79%

**Tabla IV.6:** cont.

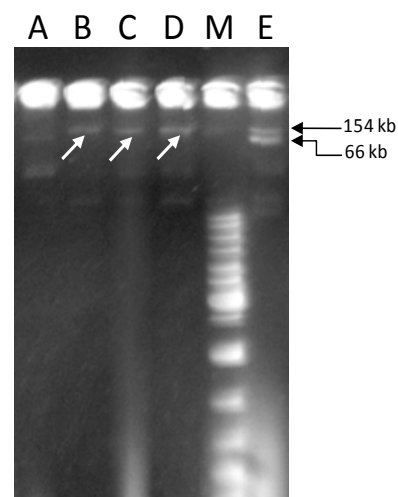
CDS	Inicio-final	Longitud (pb)	Homólogo	Nº acceso	Identidad	Similitud
CDS_153	137341-138318	978	Proteína hipotética ( <i>Aliivibrio salmonicida</i> )	GI:209809719	39%	55%
CDS_154	138393-138539c	147	Sin homologías			
CDS_155	139026-139268	243	Proteína hipotética ( <i>V.splendidus</i> )	GI:218709571	48%	71%
CDS_156	139778-140005	228	Proteína hipotética ( <i>V. coralliilyticus</i> )	GI:260778716	42%	59%
CDS_157	141095-142021	927	OmpU ( <i>V. angustum</i> )	GI:90580498	61%	74%
CDS_158 <sup>(2)</sup>	143779-144081c	303	Proteína hipotética ( <i>V. fischeri</i> )	GI:197336633	71%	82%
CDS_159 <sup>(2)</sup>	144151-145143c	993	Proteína hipotética ( <i>V. fischeri</i> )	GI:197336644	73%	84%
CDS_160	145403-146614	1212	Factor impulsador de la división celular ( <i>Shewanella benthica</i> )	GI:163751046	42%	60%
CDS_161	146901-147221	321	Proteína hipotética ( <i>P. profundum</i> )	GI:54301971	95%	100%
CDS_162	147218-147493	276	Proteína hipotética ( <i>P. profundum</i> )	GI:54301972	87%	95%
CDS_163	147646-147942	297	Proteína hipotética ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> )	GI:118614777	90%	94%
CDS_164 <sup>(2)</sup>	148300-148509	210	Transposasa ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> )	GI:288551481	85%	89%
CDS_165 <sup>(2)</sup>	149033-149155	123	Transposasa ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> )	GI:288551481	80%	83%
CDS_166	149311-149907c	597	Proteasa/ amidasa intracelular ( <i>P. profundum</i> )	GI:54302174	88%	94%
CDS_167	150736-151947	1212	Proteína hipotética ( <i>P. profundum</i> )	GI:90409752	55%	74%
CDS_168	152030-152224	195	Proteína hipotética ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> )	GI:288551482	90%	93%
CDS_169 <sup>(2)</sup>	152233-152538	306	Transposasa ( <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> )	GI:288551481	94%	97%
CDS_170 <sup>(2)</sup>	152807-153004c	198	Transposasa ( <i>Vibrionales bacterium</i> )	GI:148979239	83%	92%
CDS_171	153074-153343c	270	Proteína hipotética ( <i>P. profundum</i> )	GI:90414137	65%	76%



### 3.3 Distribución de pPHDD1 en las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela*: correlación con el fenotipo hemolítico

Para estudiar la distribución y diversidad de plásmido pPHDD1 en *P. damsela* subsp. *damsela*, seleccionamos 17 cepas de diferentes orígenes y las analizamos por PCR para comprobar la presencia de diferentes genes ubicados a lo largo del plásmido. Los genes testados fueron: *dly*, *hlyA*, *parA*, *vep07*, *tolC*, *rcpA* y *tadC* (dos genes del locus *tad*), y también los genes *repA* y *orf2* pertenecientes a las inserciones A y B respectivamente (Tabla IV.7). Pudimos comprobar que únicamente 6 de las 17 cepas fueron positivas para los siete primeros marcadores utilizados, poniendo de manifiesto la vinculación genética existente entre todos los genes testados, así como la existencia de una distribución diferencial de plásmidos tipo pPHDD1 entre las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela*. Cuando se evaluaron los genes *orf2* y *repA* de las inserciones A y B pudimos comprobar que tan sólo la cepa RM-71 resultó ser positiva para estos marcadores, indicando la exclusividad de estas inserciones en dicha cepa. Para obtener una evidencia física de la

presencia de pPHDD1, se extrajo el contenido plasmídico de tres cepas positivas para los siete marcadores (RG-91, RM-71 y ATCC 33539) y una negativa (PG-801) para dichos marcadores. La migración por electroforesis reveló la presencia de una banda de 100 MDa en las tres cepas positivas y la ausencia de la misma en la cepa negativa para los genes específicos de pPHDD1 (Figura IV.13), por lo que se puede establecer una relación entre presencia de pPHDD1 y la aparición de esta banda de 100 MDa.



**Figura IV.13:** Electroforesis en gel de agarosa de una extracción de ADN plasmídico de cepas de *P. damsela* subsp. *damsela*. (A) PG-801, (B) RG-91, (C) RM-71, (D) ATCC 33539, (M) Marcador, (E) *E. coli* 39R861.

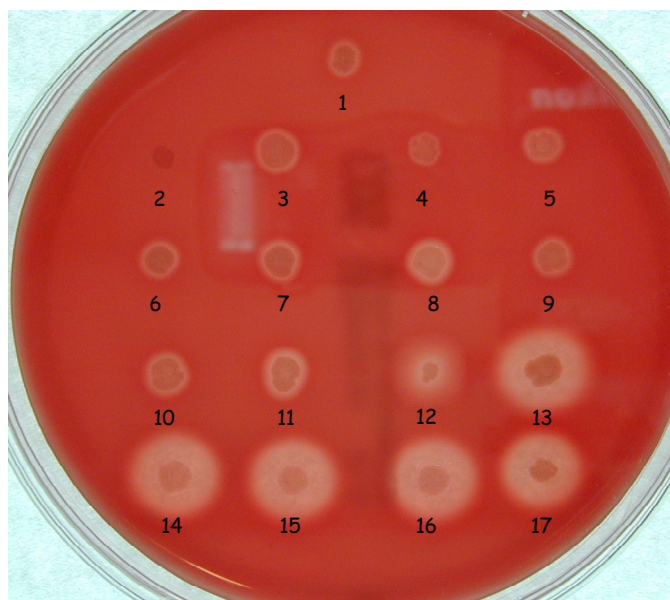
**Tabla IV.7:** Detección por PCR de genes específicos de pPHDD1 en una colección de cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* de diferentes orígenes. *orf2* y *repA* son genes localizados en las inserciones A y B exclusivas de la cepa RM-71. (HG) halo grande, (HM) halo mediano, (HP) halo pequeño y (NH) no hemólisis.

Cepas	Genes testados								Fenotipo hemolítico*
	<i>tadC</i>	<i>dly</i>	<i>hlyA</i>	<i>repA</i>	<i>vep07</i>	<i>tolC</i>	<i>parA</i>	<i>rcpA</i> (ORF125)	
RM-71	+	+	+	+	+	+	+	+	HG
RG-91	+	+	+	-	+	+	+	+	HG
RG-153	+	+	+	-	+	+	+	+	HG
RG-214	+	+	+	-	+	+	+	+	HG
CDC-2227-81	+	+	+	-	+	+	+	+	HG
ATCC 33539	+	+	+	-	+	+	+	+	HM
LD-07	-	-	-	-	-	-	-	-	HP
340	-	-	-	-	-	-	-	-	HP
309	-	-	-	-	-	-	-	-	HP
158	-	-	-	-	-	-	-	-	HP
162	-	-	-	-	-	-	-	-	HP
PG-801	-	-	-	-	-	-	-	-	HP
192	-	-	-	-	-	-	-	-	HP
238	-	-	-	-	-	-	-	-	HP
ATCC 35083	-	-	-	-	-	-	-	-	HP
J3G801	-	-	-	-	-	-	-	-	NH
PC586.1	-	-	-	-	-	-	-	-	HP

\*El fenotipo hemolítico se ha establecido en base al tamaño del halo hemolítico producido en sangre de oveja. HG: halo grande (0,8-1 cm), HM: halo mediano (0,5-0,6 cm), HP: halo pequeño (0,4-0,1 cm), NH: No hemólisis

En trabajos previos se había demostrado que los aislados de *P. damsela* subsp. *damsela* procedentes de seres humanos y de peces que mostraban los valores más altos de actividad hemolítica presentaban una hibridación positiva con una sonda de ADN del gen *dly*, (Cutter & Kreger, 1990). Puesto que este gen se encuentra localizado en pPHDD1, decidimos comprobar si la presencia de pPHDD1 se podía correlacionar con la actividad hemolítica. En primer lugar pudimos confirmar que todas las cepas ensayadas, a excepción de una, producían hemólisis en placas de agar sangre (Figura IV.14). Sin embargo, las cepas positivas para los genes de pPHDD1 (cepas 12 a 17) mostraron un halo hemolítico cuyo tamaño fue aproximadamente 5 veces mayor que el halo producido por las cepas negativas para los marcadores de pPHDD1. Estos resultados muestran claramente que la presencia de pPHDD1 confiere la capacidad de producir un gran halo hemolítico, mientras que el halo hemolítico pequeño es característico de aquellas cepas que carecen de dicho plásmido. La cepa tipo ATCC

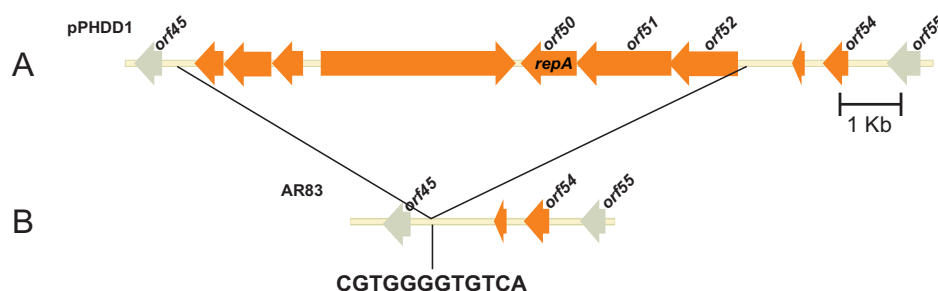
33539 produce un halo intermedio, que denominaremos halo mediano. En resumen, proponemos definir cuatro tipos o categorías de halo hemolítico en agar sangre con sangre de oveja para las cepas de esta subespecie, que nos serán útiles en las descripciones posteriores al estudiar las cepas mutantes: (HG) halo grande (0,8-1 cm), (HM) halo mediano (0,5-0,6 cm), (HP) halo pequeño (0,4-0,1 cm) y (NH) no hemólisis (Tabla IV.7 y Figura IV.14). Definimos el tamaño del halo de hemólisis como la distancia entre el borde externo de la zona de crecimiento bacteriano y el extremo de la zona hemolizada.



**Figura IV.14:** Fenotipos hemolíticos de una colección de 17 cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* en agar sangre de oveja. (1) PC586.1; (2) J3G801; (3) ATCC 35083; (4) 238; (5) 192; (6) PG-801; (7) 162; (8) 158; (9) 309; (10) 340; (11) LD-07; (12) ATCC 33539; (13) CDC-2227-81; (14) RM-71; (15) RG-214; (16) RG-153; (17) RG-91.

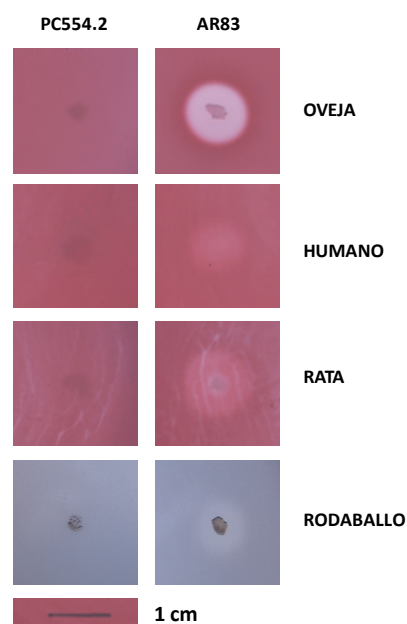
### 3.4 pPHDD1 puede conjugarse a *P. damselae* subsp. *piscicida* y conferirle actividad hemolítica

Como se ha descrito anteriormente, pPHDD1 contiene un operón de genes *tra* que codifica funciones relacionadas con la transferencia conjugativa, lo que sugiere que pPHDD1 podría ser movilizado por transferencia horizontal a otras especies bacterianas. Para comprobar esta hipótesis, conjugamos la cepa AR61, que presenta una versión de pPHDD1 marcada con kanamicina (contiene la inserción del plásmido suicida pNidkan que lleva la construcción génica utilizada para mutar el gen *dly*) con la cepa PC554.2 de *P. damselae* subsp. *piscicida* resistente a tetraciclina. Después de la conjugación obtuvimos a una muy baja frecuencia, aproximadamente  $10^{-8}$  exconjugantes de *P. damselae* subsp. *piscicida* resistentes a tetraciclina y kanamicina. Sembrando en LB con sacarosa al 15% seleccionamos en la cepa exconjugante un segundo evento de recombinación en el cual el plásmido suicida se libera sin producir una delección en el gen *dly*, obteniendo una cepa sensible a kanamicina (AR83) con una versión intacta de pPHDD1. Tras analizarla por PCR, dicha cepa resultó ser positiva para diferentes genes específicos de la subsp. *piscicida*, así como para todos los marcadores específicos de pPHDD1 utilizados anteriormente, con la excepción de *repA* (*orf50*) que resultó ser negativa, sugiriendo que la inserción B es inestable y pudo haberse perdido. Mediante análisis por PCR comprobamos que efectivamente se había perdido una región de 9.202 pb, y tras secuenciar dicha región pudimos observar que está flanqueada por una perfecta repetición directa de 12 pb (CGTGGGGTGTCA) (Figura IV.15). Esta repetición podría ser la secuencia de reconocimiento de alguna de las integrasas codificadas por los genes *orf51* y *orf52*. Estos resultados confirman que pPHDD1 es un replicón independiente que puede ser transferido mediante conjugación a otras especies bacterianas.



**Figura IV.15:** Región de ADN correspondiente a la inserción B en pPHDD1 (ORFs en naranja) (A). Inserción B de pPHDD1 en AR83; tras la conjugación a la cepa PC554.2 de *P. damsela* subsp. *piscicida*, la inserción B perdió 9.202 pb probablemente debido a una recombinación surgida entre dos repeticiones directas de ADN (resaltado en la figura). La región de ADN perdida está delimitada mediante líneas (B).

Puesto que pPHDD1 está involucrado en la producción de un halo hemolítico grande (HG) en algunas cepas de *P. damsela* subsp. *damsela*, decidimos evaluar la hemólisis producida por la cepa AR83 (contiene pPHDD1) y la cepa receptora de *P. damsela* subsp. *piscicida* PC554.2, la cual no es hemolítica en placas de agar sangre con sangre de oveja, sangre humana, de rata y de rodaballo (Fig. IV.16). Tras 15 h de incubación a 25 °C pudimos observar una clara hemólisis en todos los tipos de sangre utilizados. AR83 produjo un halo de hemólisis cuyo tamaño fue un 63% del tamaño del halo producido por la cepa parental AR57 (cepa resistente a rifampicina derivada de la cepa RM-71). Sin embargo, la hemólisis producida en sangre de rata, humana y de rodaballo fue muy débil, lo que sugiere que otros factores adicionales, no codificados en pPHDD1, están involucrados en la producción del fuerte fenotipo hemolítico mostrado por la cepa AR57, o que quizás los determinantes hemolíticos de pPHDD1 no alcanzan en la subsp. *piscicida* las condiciones óptimas de expresión.



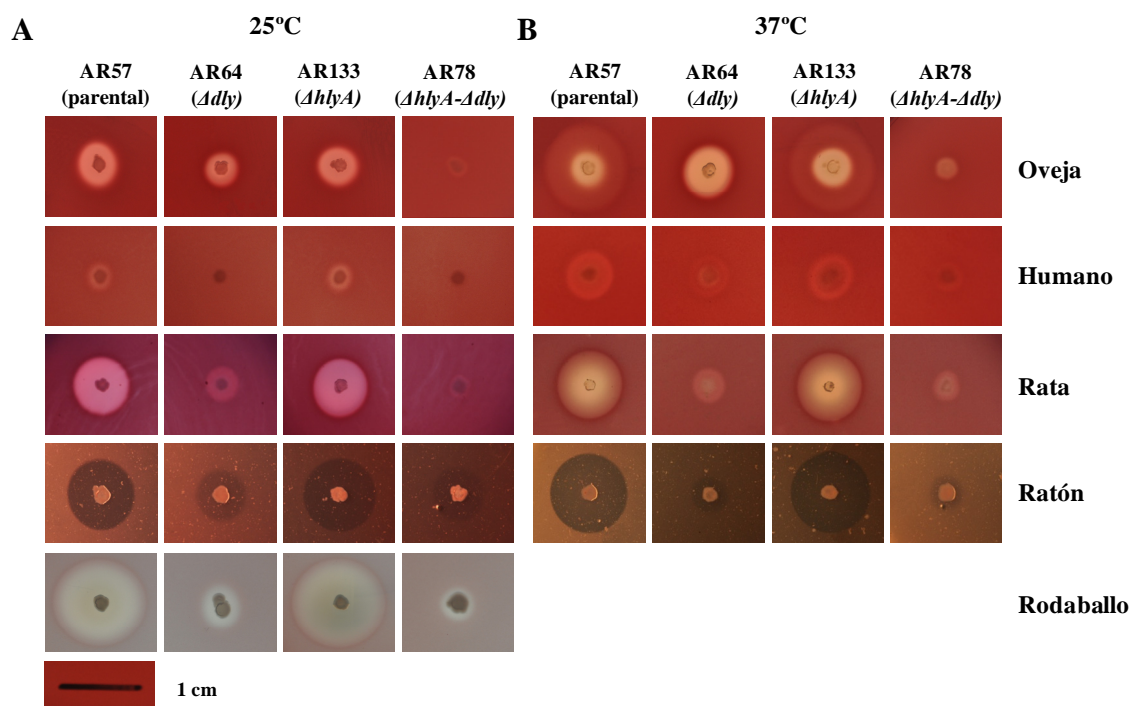
**Figura IV.16:** Hemólisis de las cepas PC554.2 y AR83 (exconjugante que adquirió pPHDD1) de *P. damsela* subsp. *piscicida* en agar sangre con sangre de oveja, sangre humana, de rata y de rodaballo a 25 °C. La barra de escala representa 1 cm.

### **3.5 La curación de pPHDD1 causa una fuerte disminución de la actividad hemolítica**

Como hemos comprobado en el apartado anterior, pPHDD1 contiene determinantes genéticos implicados en la actividad hemolítica. Para obtener evidencias adicionales sobre el papel que juega este plásmido en la hemólisis de *P. damsela* subsp. *damsela*, decidimos tratar de curar pPHDD1 en la cepa parental AR57. La obtención de una cepa curada se realizó a partir de una primera inserción del vector suicida pNidkan que llevaba la construcción génica para crear un mutante por intercambio alélico del gen *hlyA* (AR67). Después de varias rondas de crecimiento en LB, se seleccionaron aquellas colonias que crecían en LB agar con un 15% de sacarosa y eran sensibles a kanamicina. Aquellas colonias que perdieron el vector suicida fueron testadas por PCR para comprobar la presencia de diferentes genes de pPHDD1 hasta encontrar colonias negativas para dichos genes. Como resultado obtuvimos, a una alta frecuencia, cepas que habían perdido el plásmido pPHDD1. Sin embargo, dichas cepas fueron incapaces de crecer a 37 °C, mostrando una considerable reducción en la actividad hemolítica que no pudo ser restablecida mediante complementación génica. Por tanto, de estos resultados parece deducirse que la curación de pPHDD1 solo puede producirse bajo circunstancias en las que probablemente tenga lugar la pérdida simultánea de otras regiones de ADN o la aparición de mutaciones espontáneas en algún lugar del genoma. Intentos posteriores de curación de pPHDD1 a partir de primeras inserciones en los genes *dly* o *hlyA*, capaces de crecer a 37 °C, fueron en vano, por lo que nos fue imposible obtener una cepa curada sin que se produjese una modificación o pérdida secundaria de ADN.

### 3.6 HlyA y Dly contribuyen a la actividad hemolítica de *P. damsela* subsp. *damsela*

Hasta el momento la actividad hemolítica de *P. damsela* subsp. *damsela* ha sido explicada exclusivamente sobre la base de la presencia del gen *dly*. En trabajos previos se estableció una relación directa entre la presencia del gen *dly* y la producción de un fenotipo altamente hemolítico (Cutter & Kreger, 1990). Sin embargo, la presencia de una hemolisina (HlyA) perteneciente a la familia de las toxinas formadoras de poro codificada en pPHDD1 suscita la duda de si Dly es la única responsable del fenotipo hemolítico o si HlyA también juega un papel importante. Basándonos en homólogos descritos en otras especies del género *Vibrio*, la hipótesis más probable es que HlyA sea una proteína con actividad hemolítica. Para desentrañar la contribución al fenotipo hemolítico de cada una de estas hemolisinas, analizamos la actividad hemolítica de los mutantes simples  $\Delta dly$  (AR64),  $\Delta hlyA$  (AR133) y del doble mutante  $\Delta dly-hlyA$  (AR78) contruidos por intercambio alélico. Los cebadores utilizados para la obtención de los mutantes de dichas hemolisinas se muestran en la Tabla III.3 (ver materiales y métodos). Puesto que *P. damsela* subsp. *damsela* es una bacteria marina que causa infecciones tanto en animales marinos como en humanos, hemos evaluado el fenotipo hemolítico de la cepa parental (AR57) y de los mutantes creados por delección (AR64, 133 y 78) en placas de agar sangre con sangre procedente de animales homeotermos (oveja, humano, ratón y rata) y poiquilotermos (rodaballo). Los ensayos de hemólisis fueron realizados a 25 °C para los cinco tipos de sangre, y a 37 °C para los cuatro tipos de sangre de homeotermos (Figura IV.17). Los resultados obtenidos indican que los eritrocitos de cada especie muestran diferentes susceptibilidades a ser hemolizados por la cepa parental AR57. Después de 15 h a 25 °C, la sangre de rodaballo, rata y ratón, seguidas por la de oveja, mostraron los halos hemolíticos de mayor tamaño, mientras que con la sangre humana se obtuvo una hemólisis menor.



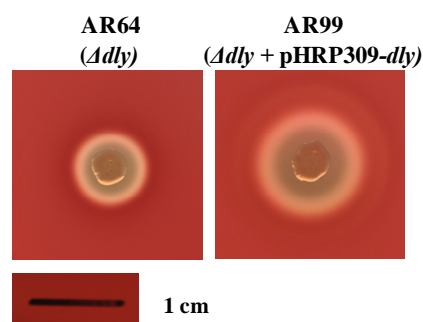
**Figura IV.17:** Ensayos de actividad hemolítica de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* AR57 (parental), AR64 ( $\Delta dly$ ), AR133 ( $\Delta hlyA$ ) y AR78 ( $\Delta dly-hlyA$ ) en placas de agar sangre con sangre de oveja, sangre humana, de rata y de rodaballo a 25 °C (A) y a 37 °C (B). La barra de escala representa 1 cm.

En los ensayos llevados a cabo a 37 °C se observaron halos hemolíticos de mayor tamaño con los cuatro tipos de sangre en todas las cepas probadas, pero en el caso de la sangre humana y de oveja el halo producido fue más translúcido, salvo en aquellas cepas mutantes para el gen *dly* (AR64), donde dicho halo desapareció, por lo que podría ser debido a la actividad hemolítica de la damselisina. Aunque en el mutante *dly* se observaron diferentes resultados dependiendo del tipo de sangre utilizada, en todos los casos se pudo observar que la mutación del gen *dly* no provoca una supresión completa de la actividad hemolítica, indicando que la damselisina no es la única responsable del fenotipo hemolítico en las cepas positivas para pPHDD1, aunque claramente contribuye a la producción del halo hemolítico grande (HG). Por ello decidimos evaluar la contribución de la otra hemolisina, la HlyA, al fenotipo hemolítico. Curiosamente la mutación de *hlyA* sólo provocó una leve reducción del halo hemolítico en los cinco tipos de sangre ensayadas, por lo que basándonos en estos resultados, proponemos que la hemólisis en *P. damsela* subsp. *damsela* se debe a la acción conjunta de las dos hemolisinas Dly y HlyA. Para demostrar esta hipótesis, evaluamos el efecto de la delección de los dos genes simultáneamente. Según lo esperado, el doble mutante  $\Delta dly-$



*hlyA* (AR78) mostró una reducción del 80% en el tamaño del halo hemolítico con todos los tipos de sangre utilizadas, descendiendo a valores similares a los mostrados por las cepas que carecen de pPHDD1. Estos resultados sugieren la existencia de un efecto aditivo entre *Dly* y *HlyA* en la producción de hemólisis, en la que además, *Dly* parece ser el contribuyente mayoritario en la hemólisis generada en sangre humana, de rata, ratón y de rodaballo. Es de destacar, sin embargo, que las cepas que carecen del plásmido pPHDD1, así como el doble mutante  $\Delta dly$ -*hlyA* (AR78), todavía retienen la capacidad de producir hemólisis, lo que sugiere la existencia de otra(s) hemolisina(s) codificadas en el cromosoma. La búsqueda de los genes responsables de este fenotipo hemolítico residual se describe más adelante en el apartado 4.

Para poder asegurar que los fenotipos observados se debían exclusivamente a la delección del gen estudiado y no a efectos polares u otras causas, se procedió a complementar las cepas mutantes con sus respectivos alelos salvajes. Se amplificaron por PCR los genes y se clonaron en el vector pHRP309 (Parales & Harwood, 1993) (ver materiales y métodos). Este plásmido no es un vector de expresión, por lo que al clonar un gen en el lugar de clonaje múltiple es necesario proporcionarle un promotor funcional. Por este motivo se decidió utilizar el promotor del propio gen, lo que permite conservar el patrón de expresión natural. Al complementar las cepas AR64 ( $\Delta dly$ ) con pAJR51 (plásmido que contiene el gen *dly* y su promotor) y AR133 ( $\Delta hlyA$ ) con pAJR53 (contiene *hlyA* y su promotor) se restauraron los patrones de hemólisis mostrados por la cepa parental (Figura IV.18).



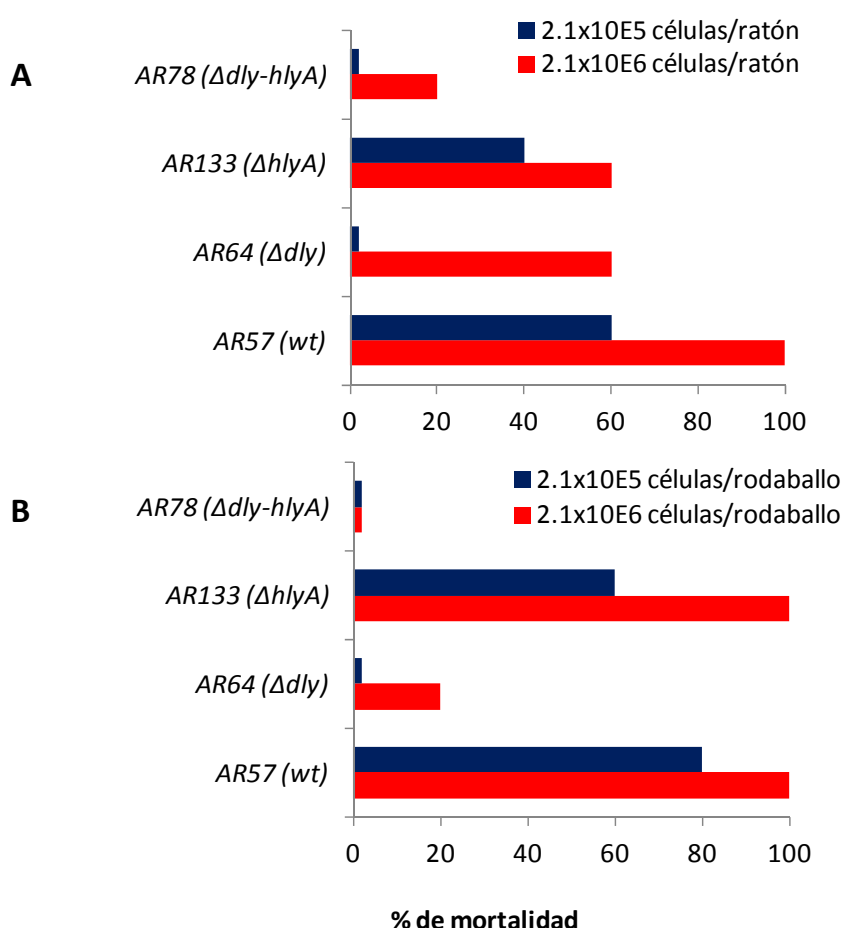
**Figura IV.18:** Hemólisis de la cepa AR64 ( $\Delta dly$ ) y su cepa complementada AR99 ( $\Delta dly$  + pHRP309\_*dly*) de *P. damsela* subsp. *damsela* en agar sangre con sangre de oveja después de 15 h de incubación a 25 °C. La barra de escala representa 1 cm.

### 3.7 Dly y HlyA contribuyen a la virulencia de *P. damsela* subsp. *damsela* para ratón y rodaballo

La damselisina ha sido reconocida como una toxina con una actividad citolítica letal para ratón (Kothary & Kreger, 1985). Se ha demostrado asimismo que la HlyA de *V. cholerae*, la cual muestra un 50% de identidad con la HlyA de *P. damsela*, juega un papel importante en la virulencia (Debellis *et al.*, 2009). Por ello, decidimos evaluar el papel de Dly y HlyA en la capacidad de *P. damsela* subsp. *damsela* para causar la muerte en ratón. Se utilizó para ello la inoculación intravenosa a través de la cola, utilizando dosis de  $2,1 \times 10^6$  y  $2,1 \times 10^5$  ufc por ratón. Los ratones murieron entre 12 y 48 h postinfección, y se recuperaron cultivos puros de *P. damsela* subsp. *damsela* a partir de los órganos internos como riñón o hígado de los ratones infectados. Mientras que la cepa parental (AR57) causó un 100% de mortalidad con la dosis alta y un 60% con la dosis baja (Figura IV.19), todos los mutantes mostraron una reducción más o menos acusada en el grado de virulencia. Los mutantes simples  $\Delta hlyA$  (AR133) y  $\Delta dly$  (AR64) causaron un 60% de mortalidad con la dosis alta, mientras que en la dosis baja sólo el mutante  $\Delta hlyA$  causó un 40% de mortalidad, siendo el mutante  $\Delta dly$  completamente avirulento. Dado que los resultados de la actividad hemolítica en placas de agar sangre sugieren efectos aditivos entre Dly y HlyA, evaluamos el efecto de la mutación simultánea de ambas hemolisinas en la virulencia. Los ensayos de virulencia con el doble mutante  $\Delta dly\text{-}\Delta hlyA$  (AR78) mostraron que la mutación de ambos genes convierte a la cepa en prácticamente avirulenta, puesto que sólo causó la muerte de un animal en la dosis más alta. Estos resultados sugieren que la presencia de HlyA es necesaria para alcanzar la máxima virulencia para ratón y que la interacción entre Dly y HlyA podría ser una interacción más bien de tipo sinérgico.

Dado que *P. damsela* subsp. *damsela* RM-71 fue aislada de rodaballos enfermos, decidimos estudiar el efecto de la mutación de *dly* y *hlyA* en la virulencia para rodaballo mediante inoculación intraperitoneal utilizando dosis de  $2,1 \times 10^4$  y  $2,1 \times 10^3$  ufc por rodaballo. Los rodaballos inoculados murieron entre 24 y 72 horas postinfección, y se recuperaron cultivos puros de *P. damsela* subsp. *damsela* de los riñones de los animales infectados. La cepa parental (AR57) causó un 100% de mortalidad con la dosis alta y un 80% con la dosis baja (Fig. IV.19). El mutante  $\Delta hlyA$  (AR133) mostró sólo una

leve reducción en la virulencia con la dosis más baja mientras que con la dosis más alta mantuvo la misma virulencia que la cepa parental. Sin embargo, el mutante  $\Delta dly$  (AR64) sólo causó un 20% de mortalidad con la dosis alta, mientras que con la dosis más baja no causó mortalidad alguna. El doble mutante  $\Delta dly-hlyA$  (AR78) fue incapaz de producir la muerte de ningún animal en cualquiera de las dosis testadas. Estos resultados no sólo sugieren la existencia de efectos sinérgicos entre Dly y HlyA sino que también muestran el importante papel que juega Dly como principal contribuyente a la virulencia de *P. damsela* subsp. *damsela* para rodaballo. Los resultados muestran además claramente que la presencia del plásmido pPHDD1 es necesaria para obtener los valores máximos de virulencia de *P. damsela* subsp. *damsela* para ratón y rodaballo.



**Figura IV.19:** Ensayos de virulencia en ratón (A) y en rodaballo (B) con cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* utilizando dos dosis diferentes. Los resultados se muestran como porcentajes de mortalidad.



#### **4. La actividad hemolítica de *P. damsela* subsp. *damsela* no reside únicamente en las hemolisinas codificadas en pPHDD1**

En el apartado anterior hemos caracterizado dos hemolisinas, Dly y HlyA, codificadas en el plásmido de virulencia pPHDD1 de la cepa RM-71 de *P. damsela* subsp. *damsela*. Sin embargo, hemos visto que tanto el doble mutante  $\Delta dly-hlyA$  (AR78) como las cepas que carecen de pPHDD1 todavía presentan una actividad hemolítica detectable en placas de agar sangre. Esta actividad hemolítica sugiere la existencia de otras hemolisinas adicionales, codificadas bien en el cromosoma o bien en elementos extracromosómicos diferentes de pPHDD1 y que posiblemente estén codificadas por genes comunes a prácticamente todas las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela*. Esta hipótesis explicaría la hemólisis basal (lo que anteriormente hemos denominado halo hemolítico pequeño o HP) observada en todas las cepas que carecen de pPHDD1, con excepción de una de ellas.

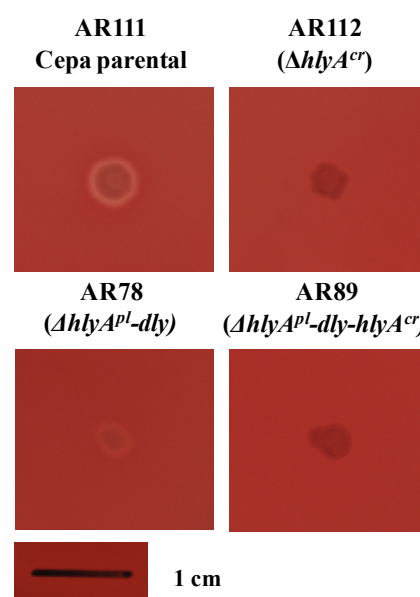
##### **4.1 *P. damsela* subsp. *damsela* produce hemolisinas adicionales codificadas en el cromosoma**

Para buscar genes de hemolisinas codificadas en el cromosoma, realizamos una búsqueda *in silico* de genes candidatos en la secuencia completa del genoma de la cepa tipo ATCC 33539. Esta búsqueda dio como resultado la identificación de dos proteínas candidatas anotadas en el genoma de la cepa tipo con los códigos VDA\_003208 y VDA\_002420, y que seleccionamos para realizar mutantes por intercambio alélico y comprobar sus fenotipos en placas de agar sangre.

VDA\_003208 muestra una identidad del 70% con una hemolisina de tipo III de 214 aminoácidos de *V. vulnificus* (GI:38489891). En el capítulo anterior habíamos observado dos fenotipos hemolíticos diferentes al sembrar una genoteca de cósmidos de la cepa RM-71 en agar sangre. Un fenotipo, de tipo  $\beta$ -hemolítico, era debido a la presencia de los genes *dly* y *hlyA*, en cambio, el otro fenotipo hemolítico, muy tenue y restringido a la zona de crecimiento bacteriano sobre el agar, era producido por un cósmido en cuya secuencia se encontró el gen de dicha hemolisina de tipo III o VDA\_003208. Dado que la hemólisis observada se produjo en *E. coli* (la cepa hospedadora del cósmido) nos planteamos que quizá dentro de la cepa parental de *P.*

*damsela* el fenotipo hemolítico podría ser más intenso y corresponderse con el halo observado en la cepa AR78. Por este motivo delecionamos por intercambio alélico el gen de la ORF VDA\_003208 en la cepa AR78 ( $\Delta dly-hlyA$ ), obteniendo por tanto una cepa triple mutante  $\Delta dly-hlyA-hlyIII$  (AR82). Al sembrar AR82 en agar sangre, pudimos observar un halo hemolítico igual al producido por la cepa AR78 ( $\Delta dly-hlyA$ ), por lo que *hlyIII* no parece ser el responsable de este fenotipo hemolítico basal observado en el doble mutante.

La segunda proteína candidata, VDA\_002420, mostró una identidad del 92% con la hemolisina HlyA codificada en pPHDD1. Dada la alta similitud entre ambos genes, de aquí en adelante serán denominados *hlyA<sup>pl</sup>* (el gen del plásmido) y *hlyA<sup>cr</sup>* (el gen cromosómico) y sus proteínas HlyA<sup>pl</sup> y HlyA<sup>cr</sup>, respectivamente. Basándonos en la secuencia disponible en la base de datos, pudimos comprobar mediante PCR, que *hlyA<sup>cr</sup>* se encontraba presente tanto en las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* que carecen de pPHDD1 como en las cepas que lo portan, lo que le hace ser un buen candidato a ser responsable de este fenotipo hemolítico basal. Por tanto, realizamos mutantes por inserción en las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* AR78 ( $\Delta dly-hlyA^{pl}$ ) y AR111 (mutante resistente a rifampicina de la cepa LD-07, que carece de pPHDD1). Como resultado pudimos comprobar que la mutación de *hlyA<sup>cr</sup>* provocaba una completa supresión de la actividad hemolítica en las cepas AR112 ( $\Delta hlyA^{cr}$ ) y AR89 ( $\Delta hlyA^{pl}-dly-hlyA^{cr}$ ) (Figura IV.20). Estos resultados demuestran que la actividad hemolítica de *P. damsela* subsp. *damsela* reside en tres genes de hemolisinas: *dly*, *hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>* en las cepas altamente hemolíticas (aquellas que contienen el plásmido pPHDD1) (halo grande) y únicamente en el gen *hlyA<sup>cr</sup>* en las cepas que carecen de pPHDD1 (halo pequeño).



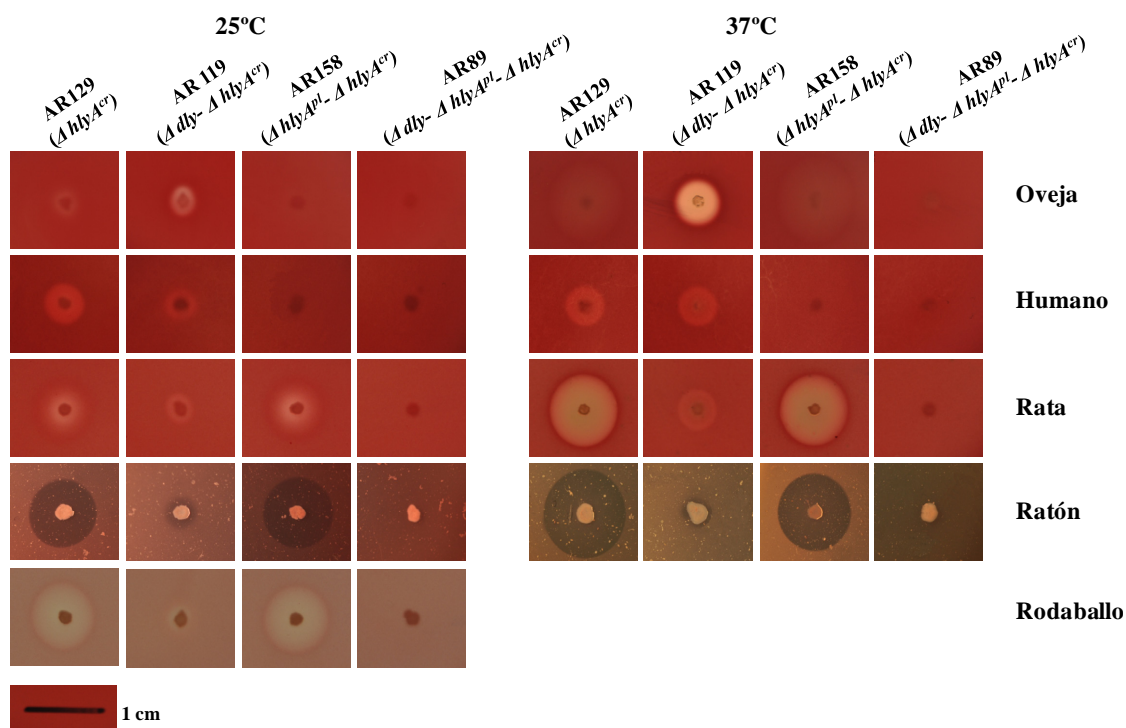
**Figura IV.20:** Hemólisis de las cepas AR111 (LD-07, Rif<sup>r</sup>), AR112 ( $\Delta hlyA^{cr}$ ), AR78 ( $\Delta hlyA^{pl}-dly$ ) y AR89 ( $\Delta hlyA^{pl}-dly-hlyA^{cr}$ ) de *P. damsela* subsp. *damsela* en agar sangre de oveja después de 15 h de incubación a 25 °C. La barra de escala representa 1 cm.

La cepa AR78 muestra una drástica reducción en su actividad hemolítica. En cambio, la mutación del gen *hlyA<sup>pl</sup>* produce una suave disminución de la actividad hemolítica, lo que nos lleva a pensar que, o bien Dly posee una gran actividad hemolítica, o bien interacciona con HlyA<sup>cr</sup> de una manera similar a las interacciones probablemente de tipo sinérgico observadas con HlyA<sup>pl</sup>. Con la idea de estudiar las posibles interacciones que pudieran existir entre las tres hemolisinas, decidimos mutar el gen de la HlyA<sup>cr</sup> por intercambio alélico realizando combinaciones de mutantes con los genes de las otras dos hemolisinas. El primer paso necesario para construir la mutación por delección de *hlyA<sup>cr</sup>* consistió en conocer la secuencia del contexto cromosómico de este gen. Basándonos en el genoma de la cepa tipo ATCC 33539 de *P. damsela* subsp. *damsela*, analizamos mediante PCR la región de ADN donde se encuentra el gen *hlyA<sup>cr</sup>* en la cepa RM-71. Curiosamente, pudimos comprobar que la cepa RM-71 contenía corriente abajo de *hlyA<sup>cr</sup>* genes que estaban ausentes en el cromosoma de la cepa ATCC 33539. Mediante PCR inversa y secuenciación obtuvimos una región de 2 kb necesaria para realizar la construcción de la copia delecionada del gen *hlyA<sup>cr</sup>*. Así se construyeron mutantes simples  $\Delta hlyA^{cr}$  (AR129) y dobles  $\Delta dly-hlyA^{cr}$  (AR119) y  $\Delta hlyA^{pl}-hlyA^{cr}$  (AR158). Las secuencias de los cebadores utilizados para la realización de los mutantes tanto por intercambio alélico como por inserción se muestran en la Tabla III.3 (ver materiales y métodos). Analizamos su actividad hemolítica en placas de agar sangre procedente de animales homeotermos (oveja, humano, y de ratón) y poiquilotermos (rodaballo). Los ensayos de hemólisis se realizaron durante 15 h a 25 °C para los cuatro tipos de sangre, y a 37 °C para la sangre de especies homeotermas (Figura IV.21).

Nuevamente pudimos observar claras diferencias en el grado de hemólisis dependiendo del tipo de sangre utilizada. Después de 15 h a 25 °C observamos que el mutante  $\Delta hlyA^{cr}$  (AR129) produjo los halos hemolíticos más grandes en los eritrocitos de ratón, rata, rodaballo y en menor medida en sangre humana, confirmando el papel activo que juega la Dly en la hemólisis de estos tipos de sangre, ya que al delecionar el gen *dly* en la cepa AR129, dando lugar al doble mutante  $\Delta dly-hlyA^{cr}$  (AR119), observamos una reducción del 80% en el halo hemolítico. En el caso de la sangre de oveja, curiosamente observamos una situación inversa, ya que el mutante  $\Delta hlyA^{cr}$  (AR129)

mostró un halo translúcido sin generar una  $\beta$ -hemólisis clara que, sin embargo, se recuperó al delecionar en la cepa AR129 el gen *dly*. Este resultado suscita la idea de una represión, probablemente sobre la  $HlyA^{pl}$ , donde la Dly parece mediar en esta represión. En el caso del doble mutante  $\Delta hlyA^{pl}-hlyA^{cr}$  (AR158), cepa que sólo produce Dly, pudimos observar que con la sangre de rata, ratón y rodaballo se conserva un halo hemolítico similar a la cepa parental AR57, lo que confirma que Dly es el principal contribuyente de la actividad hemolítica en estos tipos de sangre. En los ensayos llevados a cabo a 37 °C se pudieron observar halos hemolíticos más grandes en aquellas cepas productoras de Dly. En el caso de la sangre humana y de oveja, el halo producido fue nuevamente más translúcido, desapareciendo en las cepas mutantes para el gen *dly*. Estos resultados ponen de manifiesto una especificidad diferencial por el tipo de eritrocitos, donde Dly parece ser muy activa frente a eritrocitos de rodaballo, ratón, rata y en menor medida frente a los humanos, y  $HlyA$  parece ser muy activa frente a eritrocitos de oveja. Además, dicha actividad hemolítica parece ser aumentada por la acción de la Dly, lo que lleva a la idea de una posible interacción de tipo sinérgico. En apartados posteriores intentaremos arrojar algo de luz a estos interrogantes, e intentar dilucidar qué tipos de interacciones existen entre las hemolisinas (aditivo o sinérgico) y qué mecanismos regulatorios se esconden tras la acción de Dly,  $HlyA^{pl}$  y  $HlyA^{cr}$ .

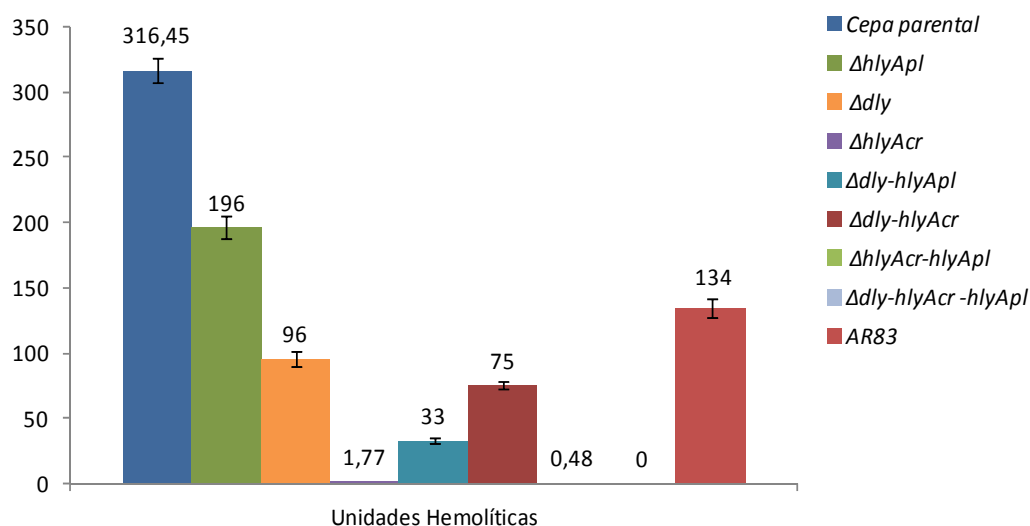




**Figura IV.21:** Ensayos de actividad hemolítica de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* AR129 ( $\Delta hlyA^{cr}$ ), AR119 ( $\Delta dly-hlyA^{cr}$ ), AR158 ( $\Delta hlyA^{pl}-hlyA^{cr}$ ) y AR89 ( $\Delta dly-hlyA^{pl}-hlyA^{cr}$ ) en placas de agar sangre con sangre humana, de oveja, rata, ratón y rodaballo después de 15 h a 25 °C (A) y a 37 °C (B). La barra de escala representa 1 cm.

#### 4.2 Ensayos de hemólisis en líquido: HlyA<sup>pl</sup> y HlyA<sup>cr</sup> presentan diferentes actividades hemolíticas

Hasta el momento, el método de detección utilizado para medir la actividad hemolítica de *P. damsela* subsp. *damsela* ha sido de tipo cualitativo, en placas de agar sangre con eritrocitos de diferentes especies, por lo que decidimos complementar nuestros resultados empleando un método de tipo cuantitativo que nos permitiese medir de forma más precisa la actividad hemolítica. Con este propósito realizamos ensayos de hemólisis en líquido con todas las combinaciones posibles de cepas mutantes para las tres hemolisinas (Dly, HlyA<sup>pl</sup> y HlyA<sup>cr</sup>) derivadas de la cepa parental AR57 (Figura IV. 22).



**Figura IV.22:** Ensayos de hemólisis en líquido utilizando eritrocitos de oveja con la cepa AR83 de *P. damsela* subsp. *piscicida* (cepa que adquirió pPHDD1 por conjugación) y cepas mutantes simples, dobles y triple de la subsp. *damsela* para las tres hemolisinas: Dly HlyA<sup>pl</sup> y HlyA<sup>cr</sup>. Los productos extracelulares fueron obtenidos lavando las células con solución salina después de crecer 48 h en placas de TSA-1 con celofán. Los ensayos de lisis se llevaron a cabo a 25 °C durante 2 h. Cada muestra se obtuvo mezclando 0,5 mL de los productos extracelulares (ajustados previamente a A<sub>630</sub> de 1) y 0,5 mL de la suspensión de eritrocitos (previamente lavados con PBS). Las Unidades Hemolíticas se obtuvieron midiendo a A<sub>540</sub> la hemoglobina liberada (ver materiales y métodos). Se define una Unidad Hemolítica (UH) como la cantidad de hemolisina necesaria para lisar el 50% de los eritrocitos.

Los resultados cuantitativos de hemólisis en líquido con suspensiones de eritrocitos de oveja mostraron una correlación con los datos cualitativos observados en las placas de agar sangre. La mutación simple de *hlyA<sup>pl</sup>* provocó un descenso en la actividad hemolítica mucho más significativo que el apreciado en las placas de agar sangre, lo que sugiere una precisión más fina con este método. Los valores obtenidos demuestran que la hemólisis no es el resultado de la mera suma de las actividades hemolíticas de cada hemolisina, sino que intervienen fenómenos de sinergia hemolítica. En dicha sinergia, Dly juega un papel preponderante, ya que la delección de Dly produce una fuerte reducción de la hemólisis (Figura IV.22). El análisis de los mutantes  $\Delta hlyA^{cr}$  (AR129) y  $\Delta hlyA^{pl}-hlyA^{cr}$  (AR158) pone de manifiesto la baja actividad hemolítica completa que ejerce Dly por sí sola sobre los eritrocitos de oveja, lo que sugiere que son las HlyAs las que verdaderamente causan la liberación de hemoglobina. La acción de Dly parece dañar la membrana de los eritrocitos de tal manera que sin alterar la integridad de la membrana facilita la acción posterior de las HlyAs. Sorprendentemente, el mutante  $\Delta hlyA^{cr}$  (AR129) mostró unos valores hemolíticos extraordinariamente bajos si

tenemos en cuenta que la cepa AR129 contiene el gen *hlyA<sup>pl</sup>* intacto, lo que nos lleva a pensar en una posible represión sobre este gen. Dicha represión no llega a ser completa del todo, ya que se detectan pequeñas cantidades de hemólisis, lo que sugiere que su promotor mantiene cierta actividad. Esta represión se halla mediada por Dly, ya que si a la cepa AR129 se le muta el gen *dly* dando lugar a la cepa doble mutante  $\Delta dly$ -*hlyA<sup>cr</sup>* (AR119), se puede observar que esta cepa recupera de nuevo su actividad hemolítica (Figura IV.22).

Si realizamos una comparativa entre las cepas AR78 ( $\Delta dly$ -*hlyA<sup>pl</sup>*) (sólo produce HlyA<sup>cr</sup>) y AR119 ( $\Delta dly$ -*hlyA<sup>cr</sup>*) (sólo produce HlyA<sup>pl</sup>) podemos apreciar que ambas hemolisinas muestran diferentes actividades hemolíticas, siendo sensiblemente más activa frente a los eritrocitos de oveja HlyA<sup>pl</sup> que HlyA<sup>cr</sup>, llegando incluso a doblar los valores obtenidos (75 UH frente a las 33 UH de HlyA<sup>cr</sup>). Además, comparando dichos valores con aquellos obtenidos en el mutante  $\Delta dly$ , se observa un claro efecto aditivo entre ellas, ya que la suma de las unidades hemolíticas obtenidas con las cepas AR78 y AR119 ronda el valor obtenido con el mutante  $\Delta dly$ . La cepa de la subsp. *piscicida* AR83 (que adquirió pPHDD1 por conjugación) no alcanzó los valores hemolíticos mostrados por la cepa parental, algo esperable que pone de manifiesto la necesidad de la participación de la HlyA<sup>cr</sup> en el fenotipo hemolítico para alcanzar valores hemolíticos más próximos a la cepa parental. También hay que tener en cuenta que la expresión de los determinantes hemolíticos en la subsp. *piscicida* podría no alcanzar las condiciones más óptimas, por ejemplo por la falta de transportadores y/o reguladores específicos que sí puedan estar presentes en la subsp. *damselae*. Finalmente, la ausencia de hemólisis en la cepa triple mutante  $\Delta dly$ -*hlyA<sup>pl</sup>*-*hlyA<sup>cr</sup>* (AR89), demuestra que la actividad hemolítica en las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* con los valores hemolíticos más altos, reside en tres hemolisinas, Dly y HlyA<sup>pl</sup>, codificadas en pPHDD1, y en HlyA<sup>cr</sup> codificada en el cromosoma.

### 4.3 Estudio de los dominios conservados en las hemolisinas HlyA<sup>pl</sup> y HlyA<sup>cr</sup>

Como hemos mencionado anteriormente, las dos HlyAs de *P. damsela* subsp. *damsela* muestran homología con hemolisinas de diferentes especies pertenecientes al género *Vibrio*. Entre éstas, se encuentra la citolisina de *V. cholerae* (VCC), una bien caracterizada toxina formadora de poro con la cual ambas comparten un 50% de identidad. Debido a la amplia información existente acerca de la estructura y modo de acción de VCC, llevamos a cabo un análisis comparativo *in silico* con el fin de proponer un posible mecanismo de acción para HlyA similar al de VCC. Debido al alto grado de identidad (92%), entre HlyA<sup>pl</sup> y HlyA<sup>cr</sup> no se hará distinción entre ellas, salvo que sea pertinente.

Las toxinas formadoras de poro (PFTs) se caracterizan por formar canales mediante la creación de poros en la membrana citoplasmática de la célula diana eucariota. VCC pertenece a este grupo de toxinas y su mecanismo de acción ha sido descrito exhaustivamente (De & Olson, 2011; Olson & Gouaux, 2003; Zitzer *et al.*, 2001). Su efecto citotóxico reside en la formación de canales oligoméricos de tipo  $\beta$ -barril en la membrana de la célula diana llevando a una hinchazón y lisis osmótica coloidal de la célula (Krasilnikov *et al.*, 2007). VCC permanece en disolución en forma de monómeros que oligomerizan entre ellos al contactar con la membrana celular (Lohner *et al.*, 2009), formando heptámeros con un diámetro de poro similar al que presenta la  $\alpha$ -toxina estafilocócica (Valeva *et al.*, 2005). La forma citolíticamente activa de VCC es una molécula de aprox. 65 kDa; sin embargo, la proteína es sintetizada en la bacteria como una molécula de aprox. 82 kDa que sufre un procesamiento durante su secreción dando lugar a una protoxina de aprox. 79 kDa. Una vez secretada, es procesada por una proteasa extracelular generando la forma madura de 65 kDa. La predicción del lugar de corte indica que éste tiene lugar entre los aminoácidos Ala-157 y Asn-158 (Yamamoto *et al.*, 1990a). Comparando estas posiciones en la HlyA de *P. damsela* subsp. *damsela* observamos una Ala-156 y una Ser-157, una coincidencia y un cambio conservativo, lo que sugiere que HlyA podría sufrir un proceso de corte similar al que ocurre en VCC.

Por otra parte, los dominios N-terminal de VCC y HlyA tienen una similitud menor que los dominios citolíticos, lo que podría ser debido a que este dominio permite una mayor diversidad aminoacídica sin afectar a la actividad citolítica, al no estar

involucrado directamente en ésta. En VCC, el dominio N-terminal es necesario para una correcta flexibilidad estructural y conformacional durante el curso de la secreción (Paul & Chattopadhyay, 2011), ya que actúa a modo de chaperona guiando el plegamiento de la protoxina (Nagamune *et al.*, 1997). Además, su presencia evita la oligomerización bloqueando el contacto entre protómeros requerido para el ensamblaje (He & Olson, 2009). El proceso de oligomerización y formación del poro requiere una serie de cambios conformacionales mediados por interacciones proteína-proteína (Lohner *et al.*, 2009). En este proceso, los enlaces disulfuro juegan un papel esencial. VCC contiene seis residuos de cisteína, de los cuales dos, que tienen el grupo sulfidril libre (Cys-182, Cys-200), son necesarios para que la proteína desnaturalizada se pliegue correctamente (Valeva *et al.*, 2005). En VCC se conocen las posiciones de los dos enlaces disulfuro intramoleculares (Cys: 497-511 y 537-549). Los residuos Cys-497 y Cys-511 forman un enlace disulfuro imprescindible para la actividad biológica y estabilidad de la protoxina (Valeva *et al.*, 2005). La HlyA de *P. damsela* contiene en las mismas posiciones estos seis residuos de cisteína, por lo que HlyA podría tener los mismos enlaces disulfuro y un plegamiento similar a VCC.

A 80 aminoácidos del lugar de activación proteolítico, comienzan los 250 aminoácidos que aproximadamente componen el dominio citolítico (Olson & Gouaux, 2003). Este dominio está relacionado con la familia Aerolisina/Hemolisina/Leucocidina de las toxinas formadoras de poro (Bateman *et al.*, 2004). La prolina 328 está conservada en las especies del género *Vibrio* pero está ausente en las toxinas estafilocócicas. Esta prolina constituye el punto de giro de las dos láminas  $\beta$  antiparalelas de cada monómero. Los aminoácidos que siguen a esta prolina muestran una hidrofobicidad alternante al menos en los ocho residuos siguientes (Valeva *et al.*, 2005). La HlyA de *P. damsela* también muestra dicha prolina en una posición muy próxima (Pro 324), además de presentar esa alternancia en la hidrofobicidad de los residuos inmediatamente posteriores al residuo de prolina, compartiendo exactamente los mismos residuos no polares en esta región conservada (Figura IV.23), lo que sugiere que ambas hemolisinas, VCC y HlyA, tienen una arquitectura común en la región de la proteína que atraviesa la membrana plasmática.



**Figura IV.23:** Alineamiento de las secuencias aminoacídicas del dominio transmembrana de VCC y HlyA. Se muestra en rojo la prolina que separa las dos láminas  $\beta$  antiparalelas. Posterior a la prolina, se muestra la región de alternancia de hidrofobicidad mostrando los residuos conservados en azul. Las flechas verdes muestran las dos láminas  $\beta$  antiparalelas.

En VCC y en las toxinas leucocidina F (LukF) y  $\alpha$ -hemolisina ( $\alpha$ -HL) de *Staphylococcus aureus* se han descrito los residuos aromáticos que ocupan posiciones clave en el núcleo del dominio transmembrana y la región que está en contacto con la membrana plasmática (Y338, W367, Y438, Y445, W475, Y260, Y279, F313, W343, Y454 y F471) (Olson & Gouaux, 2003). Si comparamos estas posiciones en la secuencia de HlyA, observamos una diferencia (W343/S339), una sustitución de tipo conservativo (Y445/F441) y nueve coincidencias exactas (Figura IV.24), lo que proporciona una clara información adicional que sugiere un plegamiento similar. Las proteínas de tipo  $\beta$ -barril se caracterizan por presentar una capa de aminoácidos aromáticos cerca de la interfase lipido/solvente (Gouaux, 1998). En VCC este anillo formado por residuos aromáticos aparece en las posiciones F313 e Y338 (De & Olson, 2011) (Figura IV.25) y en el caso de HlyA, también aparece este anillo con los mismos residuos en las posiciones F309 y Y334. El punto más estrecho del  $\beta$ -barril está formado por siete residuos de triptófano (W343) (De & Olson, 2011), en cambio, HlyA muestra en esa posición una serina (S339) (Figura IV.23). Este cambio aminoacídico podría implicar un mayor diámetro del  $\beta$ -barril, lo que permitiría el paso de moléculas más grandes a través de él. Aunque esta posición está conservada en muchas especies del género *Vibrio*, esta diferencia no es exclusiva de HlyA, ya que *V. vulnificus* muestra en esa posición una treonina y las especies del género *Aeromonas* presentan esta posición conservada con una glutamina. La posición W367 está conservada y se encuentra expuesta al solvente en LukF y  $\alpha$ -HL. En VCC forma un bolsillo de unión para un grupo lipídico (Olson & Gouaux, 2003). HlyA también muestra un triptófano en esta posición (W363) (Figura IV.24), por lo que podría actuar de la misma manera que en VCC. Un número de residuos hidrofóbicos no aromáticos localizados a lo largo de las secuencias proteicas de LukF,  $\alpha$ -HL y VCC se encuentran

conservativamente sustituidos o son idénticos (L251, I292, I353, I398, V407, I434, V447 y V473) (Olson & Gouaux, 2003). En el caso de HlyA, solo una posición (V447), que es reemplazada por glicina (G443), se sale del patrón establecido. Este análisis comparativo pone de manifiesto que el núcleo principal de HlyA comparte homología estructural con  $\alpha$ HL, LukF y VCC.

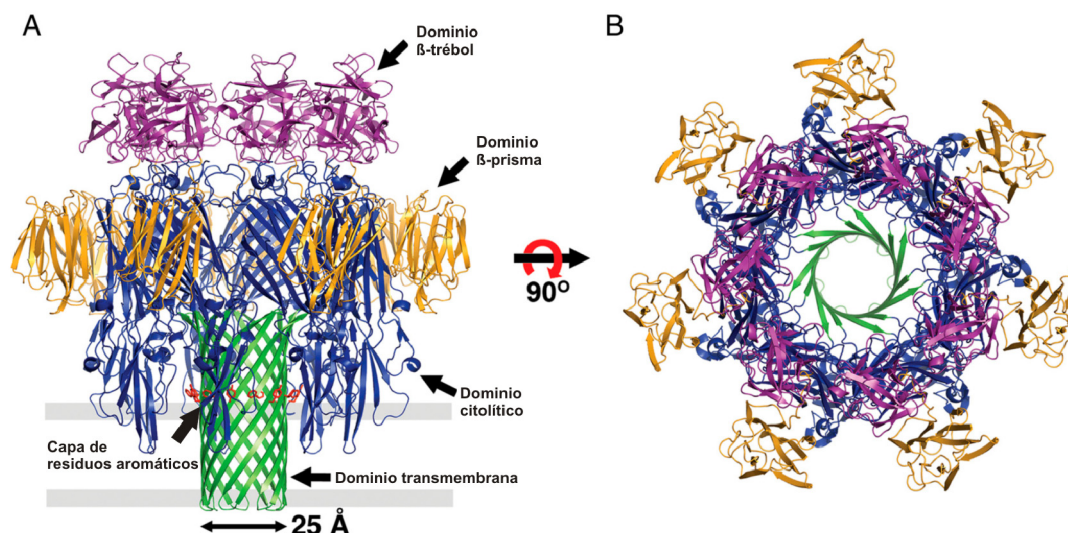
El dominio lectina ( $\beta$ -trébol) de 14 kDa se encuentra conectado con el dominio citolítico por una fenilalanina (F480). Este residuo, que también se encuentra presente en HlyA, es necesario para la oligomerización de la hemolisina relacionada con VCC de *V. vulnificus* (Kashimoto *et al.*, 2009). VCC presenta un segundo dominio lectina ( $\beta$ -prisma) que está ausente en especies de género *Aeromonas*, al igual que en HlyA, lo que explica el diferente tamaño que presenta con respecto a VCC. Los dominios lectina están implicados en la unión a carbohidratos, y posiblemente sean las moléculas de la membrana plasmática de la célula diana que reconozca la toxina. Se ha propuesto que la glicoforina B glicosilada actúe como receptor de VCC (Zhang *et al.*, 1999), aspecto que encaja con el hecho que VCC permanece unida a la membrana celular a través de carbohidratos durante todo el proceso de ensamblaje. Aunque estas interacciones no afectan significativamente a la actividad hemolítica (He & Olson, 2009), la presencia de los dominios lectina en VCC juegan un papel significativo en la generación de un canal funcional que aumenta la actividad formadora del poro (Mazumdar *et al.*, 2011). La mayoría de los miembros de esta familia presentan dos o tres puentes disulfuro conservados, así como también tres motivos QxW (Olson & Gouaux, 2003). El dominio lectina de HlyA muestra dos puentes disulfuro y dos dominios QxW (Figura IV.24), y al igual que VCC, carece de un tercer dominio QxW, algo consistente con el hecho de que muchos dominios lectina  $\beta$ -trébol han perdido actividad en una o más de estas regiones (Notenboom *et al.*, 2002).

VCC 208	IYRVNLERSLQYGIVGSATPD	AKIVRISLDDDDSTGAGIHLNDQ	L	GYRQFGAS	Y	TTLDAYF
HlyA 204	IY+V LERSL +G G	ATPD	AKIVRISLDD++TGAGIHLND	L	++++ A+Y + +	
VCC 268	REWSTDAIAQDY	RFVFNASNNKAQ	I	LKTFPVDNINEKFERKEVSG	F	ELGVTGGVEVSGDG
HlyA 264	REWS AIAQDY F	+ SN KAQ	I	LKTFPVDNINEKFERKEVSG	F	ELGVTGGVEVSGDG
VCC 328	PKAKLEARAS	TQSRWLT	YNTQDYRI	ERNAKNAQAVSFT	W	NRQQYATAESLLNRSTDALW
HlyA 324	PKA L+A ASV+QS+	L++NTQDYR	+E+N+ +AQ	VSF W	R+QY +ESLL++ T+ +W	
VCC 388	VNTYPVDVNR	I	SPLSYASFV	PKMDVIYKASATETGSTD	F	IDSSVNI
HlyA 384	SEGYPANLKKV	Q	PLSYASFV	PKLDVIYKASPNETGKTQFT	IDSSVNI	IMPLYNRSWFYFYG
VCC 448	VG	AHQF	Y	HGFEDTPRRRITKSAS	F	TVDM
HlyA 444	+GAHQ	Y	+G +D P RR+ K+	S	F	TVDM+HPVFTGG PVNLQLASFNN+CI + +++++
VCC 508	ANT	DSQ	QSA	QSF	IYDQLGRYVSASNTKL	CLDGEALDALQP
HlyA 504	TAE	D	INSKS	QSF	IYDQY	RYVSA+NTKLCLDGE+L LQ C+ LTQ+W W D L

**Figura IV.24:** Alineamiento de las secuencias de VCC y HlyA. En color se muestran los residuos hidrofóbicos y aromáticos que ocupan posiciones clave en VCC. en rojo, residuos estrictamente aromáticos. En verde, residuos aromáticos sustituidos conservativamente. En naranja, residuos hidrofóbicos no aromáticos. En amarillo, motivos de unión a carbohidratos (QxW). En azul, puentes disulfuro (C497/C511, C537/C548). En negrita, aminoácidos que difieren entre HlyA<sup>pl</sup> y HlyA<sup>cr</sup> en *P. damsela* subsp. *damsela*.

Aunque en HlyA<sup>pl</sup> y HlyA<sup>cr</sup> los aminoácidos que ocupan posiciones clave a lo largo de la secuencia proteica son exactamente iguales, el alineamiento de las secuencias correspondientes a las regiones promotoras mostró grandes diferencias. Puesto que *hlyA<sup>cr</sup>* se encuentra presente en cepas que carecen de pPHDD1, cabe la posibilidad de que el origen de *hlyA<sup>pl</sup>* provenga del contexto cromosómico de *hlyA<sup>cr</sup>*. En línea con esta idea, la región promotora de *hlyA<sup>pl</sup>* parece haber experimentado tres pequeñas deleciones (Figura IV.26), lo que podría conllevar una diferente regulación con respecto a *hlyA<sup>cr</sup>*. En apartados posteriores analizaremos la regulación transcripcional en los tres genes de hemolisinas (*dly*, *hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>*) mediante la creación de fusiones transcripcionales con el gen *lacZ*.





**Figura IV.25:** Esquema del ensamblaje de VCC en la membrana de la célula diana (A) y visión superior de la toxina formada por los siete monómeros que conforman el heptámero funcional (B). La HlyA de *P. damselae* subsp. *damselae* al carecer del dominio β-prisma no presentaría las espículas de color dorado que se muestran en la figura B. Figura tomada de De & Olson, 2011.

```

HlyAP1 TAATGTAAATCATTATCATGTGGATGAGGCTATTATATGTCAAATTTACTCCATACTTA 960
HlyAcr TTATCATTAATCATTATCATGTGCTGTGAGGTGATTATATGTCAAGCTTACTCAATACTTG 287
* * * * *

HlyAP1 TATTATCTCGCATCTTTTTCATCAAAATTAATGATAGTTGGAATCTGTAATGCTTACCA 1020
HlyAcr TATTATCTCGCATAT--TTTTCATCAAT--GATAGTTGGAATCTGTAATGCTTACCTC 340
* * * * *

HlyAP1 ATGTATTTGTAAACTTTGGTTATAGTTGACATCATTCCTACCTGTACACTAACTACC 1080
HlyAcr ATGTATTTGATTAATTCCTGGTTATAGCAGCCCTCACCTCACTACACTAACTACC 400
* * * * *

HlyAP1 TTTTCTTAATATATATTAACATTTACTAATTAGATGTGTAATAACAAACAGGATCT 1139
HlyAcr TTTTCTTAATATATATTAACATTTACTAATTAGATGTGTAATAACAAACAGGATCT 460
* * * * *

HlyAP1 CAATAGTAAAAAGTAATATGAATTGAAATTTTG-GCTG-----TTTTC 1184
HlyAcr CAATAGTAAAAAGTAATATGAATTGAAATTTTGAGCAGAGAGGAGATATTATTTTA 520
* * * * *

HlyAP1 AGTTT--ATAAC-----TTATACAGAGATAAAAC 1212
HlyAcr AAATTTGATTAACGTACGAAGAGTTAGGAGGGTCTAATCAGTTATATAGAGATAAGAA 580
* * * * *

HlyAP1 GAATCTATTCTTTGGAGTAAATAATTAAATAAGGATGATCTGAATACATTTATTGATATG 1272
HlyAcr GGATTTATTCTCTGGAGTAAATAATTAAATAAGGATGATCTGAATACATTTATTGATATG 640
* * * * *

HlyAP1 AGAACAGAACGATTATTTAAAACTATT-----GTAATAAAATG 1312
HlyAcr AGAGTGTAAATATTATACAAAAATATTTAATTATTAAAAATATATTGTAAACGCATAATG 700
* * * * *

HlyAP1 TTCATATGGAGACTTTATG 1331
HlyAcr TTTATATGGGATTTATG 719
* * * * *

```

Met→

**Figura IV.26:** Alineamiento de las secuencias de ADN correspondientes a las regiones promotoras de *hlyA<sup>P1</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>*. En rojo, zonas de homología. La metionina señala el inicio de la transcripción y la flecha señala la dirección.

#### **4.4 Sinergia hemolítica. Existencia de reacciones CAMP en *P. damselae* subsp. *damselae***

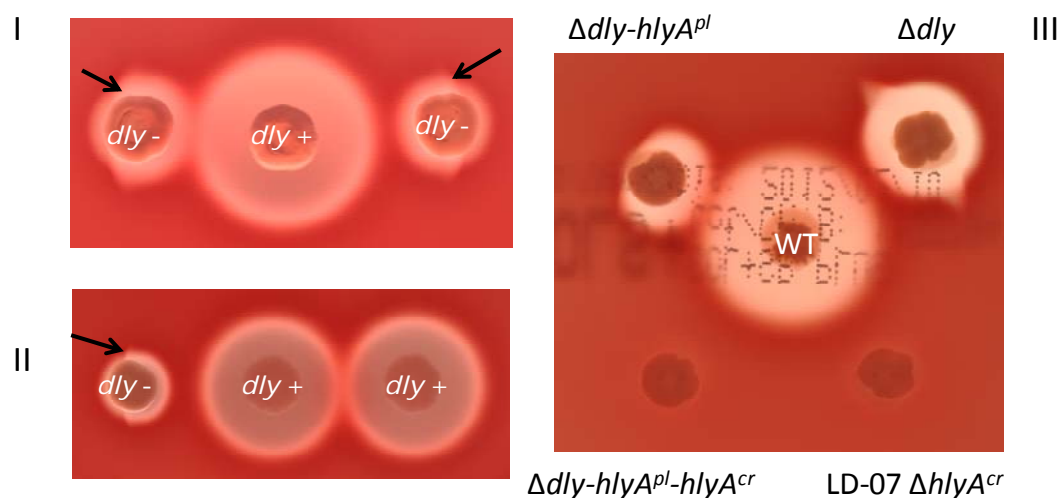
Un proceso cooperativo hemolítico es el resultado de la interacción de al menos dos factores activos frente a la membrana del eritrocito. Normalmente es un proceso que conlleva dos pasos, donde un primer agente modifica la membrana del eritrocito de manera sub-lítica o no lítica, haciéndola vulnerable o más accesible a la acción de un segundo agente que provoca la lisis posterior de la membrana del eritrocito. Las fosfolipasas suelen actuar como primeros agentes. Como segundos agentes, también llamados “proteínas CAMP”, tenemos un grupo más heterogéneo, que engloba exoproteínas como fosfolipasas, lipasas o colesterol oxidasas (Linder, 1984). Un proceso cooperativo hemolítico bien caracterizado es la reacción CAMP. Esta reacción hemolítica sinérgica se debe a la interacción del factor CAMP de estreptococos del grupo serológico B (*S. agalactiae*) con la  $\beta$ -hemolisina estafilocócica y su nombre procede de las iniciales de los autores que describieron este fenómeno por primera vez (Christie, Atkins y Munch-Petersen) (Christie *et al.*, 1944). El mecanismo de la reacción CAMP reside en la acción secuencial de la esfingomielinasa C estafilocócica que transforma esfingomielina en ceramida y colina-fosfato, con la acción posterior del factor CAMP, que al unirse a la ceramida provoca una inestabilidad en la membrana plasmática que conlleva posteriormente a la lisis celular (Bernheimer *et al.*, 1979).

La damselisina (Dly) de *P. damselae* subsp. *damselae* es una esfingomielinasa que transforma la esfingomielina en ceramida y colina fosfato (Kreger *et al.*, 1987), pudiendo actuar como “primer agente” en reacciones CAMP. En el presente estudio, hemos apreciado la existencia de fenómenos de sinergia hemolítica con otras hemolisinas producidas por *P. damselae* subsp. *damselae*, las cuales podrían actuar como “segundos agentes”, por lo que no descartamos la existencia de reacciones CAMP entre cepas de *P. damselae* subsp. *damselae*. Para probar la existencia de dichas reacciones, sembramos diferentes cepas hemolíticas de *P. damselae* subsp. *damselae* en agar sangre separadas por unos pocos centímetros y observamos el tipo de halos hemolíticos producidos (Figura IV.27).

Pudimos observar que aquellas cepas hemolíticas de *P. damsela* subsp. *damsela* que carecen de pPHDD1, o bien aquellas que lo tienen pero a las que se les ha deletado el gen *dly* (por lo que no producen Dly), producen un halo hemolítico con forma de media luna en las áreas en contacto con la región parcialmente lisada (Figura IV.27(I)). Dicha región podría derivar de la acción esfingomielinasa de la Dly, lo que sugiere que Dly está directamente implicada en las reacciones de sinergia hemolítica observadas. Este efecto sinérgico es más patente cuando la cepa de *P. damsela* subsp. *damsela* que produce Dly es sembrada con anterioridad o bien simultáneamente en la proximidad de una cepa hemolítica que no produzca Dly, ya que este efecto sólo puede ser apreciado en cepas que no producen Dly. Sorprendentemente, cuando confluyen los halos de dos cepas productoras de Damselisina, no se produce sinergia (Figura IV.27(II)), y se pueden apreciar unas estructuras con forma de panal de abeja (Figura IV.28).

Anteriormente hemos demostrado que las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* que contienen el plásmido pPHDD1 poseen dos copias de *hlyA* (*hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>*). Las cepas que carecen de pPHDD1 presentan una copia cromosómica de *hlyA* (*hlyA<sup>cr</sup>*). Dado que las reacciones CAMP ocurren en todas las cepas hemolíticas de *P. damsela* subsp. *damsela* siempre y cuando no produzcan Dly, HlyA podría ser el “segundo agente” implicado en las reacciones CAMP. Para probar esta hipótesis, sembramos la cepa parental (AR57) en agar sangre, y alrededor sembramos cuatro cepas (Figura IV.27(III)): AR64 ( $\Delta dly$ ), que produce HlyA<sup>pl</sup> y HlyA<sup>cr</sup>, AR78 ( $\Delta dly$ -*hlyA<sup>pl</sup>*), que produce HlyA<sup>cr</sup>, AR89 ( $\Delta dly$ -*hlyA<sup>pl</sup>*-*hlyA<sup>cr</sup>*) y AR112 (LD-07  $\Delta hlyA<sup>cr</sup>$ ) que no tienen actividad hemolítica. Pudimos observar que AR64 ( $\Delta dly$ ) produce una pequeña reacción de tipo CAMP con forma de media luna en el borde de la zona parcialmente hemolizada. Debido a que AR64 produce las dos HlyA, sería esperable un mayor efecto CAMP que el observado en AR78 (solo produce HlyA<sup>cr</sup>). Este hecho podría estar relacionado con fenómenos de difusión, es decir, que el halo hemolítico sólo difunda hasta una distancia máxima determinada, o como ocurre en las reacciones CAMP en *V. cholerae*, la zona de hemólisis producida sin efecto CAMP enmascara parcialmente la zona de hemólisis producida por la reacción CAMP (Lesmana *et al.*, 1996). Como se esperaba, las cepas AR89 y AR112 no experimentaron reacciones CAMP, lo que demuestra claramente que

HlyA<sup>cr</sup>, y probablemente también HlyA<sup>pl</sup>, actúan como segundos agentes en las reacciones CAMP observadas entre las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae*.



**Figura IV.27:** Reacciones CAMP en *P. damselae* subsp. *damselae*. Las cepas que presentan el plásmido pPHDD1 (*dly*+) producen reacciones CAMP con aquellas cepas hemolíticas negativas para *dly* (*dly*-) (I). Sin embargo no se pueden apreciar reacciones CAMP entre dos cepas positivas para *dly* (II). Reacciones CAMP entre AR57 (wt), AR64 ( $\Delta dly$ ), AR78 ( $\Delta dly-hlyA^{pl}$ ), AR89 ( $\Delta dly-hlyA^{pl}-hlyA^{cr}$ ) y AR112 (LD-07  $\Delta hlyA^{cr}$ ) (III). Las reacciones CAMP ocurren entre una cepa productora de damselisina (se señala el halo de la damselisina con flechas negras) y cepas que no producen damselisina pero sí alguna de las dos HlyAs, ya que las reacciones CAMP desaparecen cuando no hay HlyA en el medio.

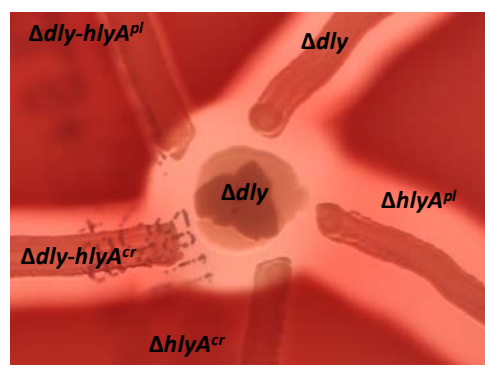
Previamente hemos demostrado que los mutantes *dly* presentaban un halo hemolítico considerablemente reducido con respecto a la cepa parental (AR57). Para descartar que este halo sea el responsable de causar las reacciones CAMP en cepas no productoras de damselisina, se sembró en el centro de una placa de agar sangre la cepa AR64 ( $\Delta dly$ ). Posteriormente y de forma radial alejándose de esta cepa se sembraron en estría cinco cepas: AR78 ( $\Delta dly-hlyA^{pl}$ ), AR64 ( $\Delta dly$ ), AR133 ( $\Delta hlyA^{pl}$ ), AR129 ( $\Delta hlyA^{cr}$ ) y AR119 ( $\Delta dly-hlyA^{cr}$ ) (Figura IV.29) para comprobar si alguna de ellas experimentaba reacciones CAMP en presencia del halo producido por la cepa AR64. Como se esperaba, no se observaron reacciones CAMP entre ninguna de las cepas testadas. Estos resultados demuestran que Dly actúa como “primer agente” en



**Figura IV.28:** Estructuras con forma de panal de abeja característico en cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* productoras de Dly. En la imagen la cepa AR129 ( $\Delta hlyA^{cr}$ ). Se señala con flechas negras la zona de formación del panal de abeja.

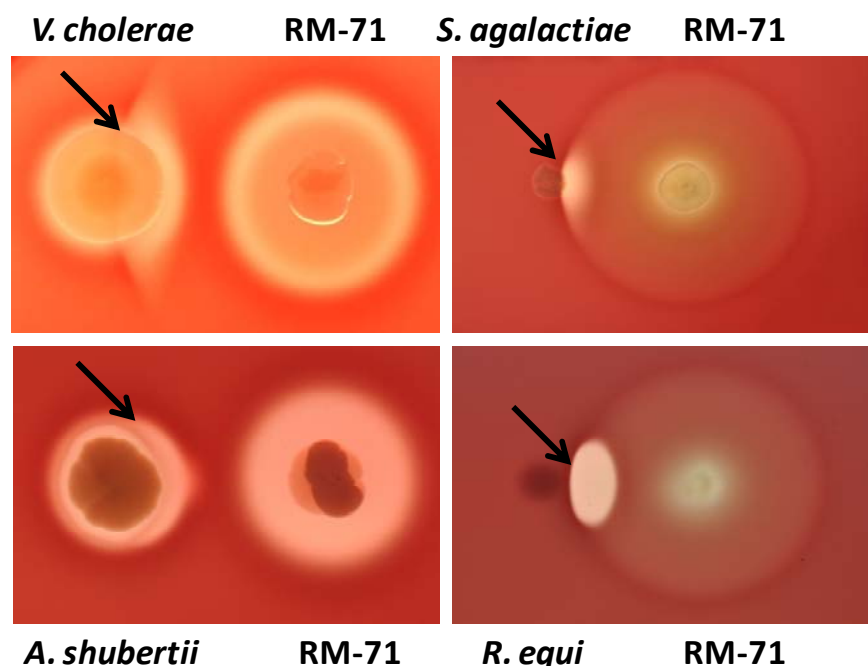
reacciones CAMP en *P. damsela* subsp. *damsela* potenciando el efecto hemolítico de las HlyAs, que actuarían como “segundos agentes”.

Anteriormente hemos demostrado que VCC y HlyA comparten características estructurales que sugieren un modo de acción similar. Puesto que Dly potencia el efecto hemolítico de HlyA en *P. damsela* subsp. *damsela*, decidimos comprobar si VCC también experimenta reacciones CAMP en presencia de Dly. Para ello sembramos la cepa N16961 de *V. cholerae* y la cepa RM-71 de *P. damsela* subsp. *damsela* en agar sangre separadas por



**Figura IV.29:** Ausencia de sinergia hemolítica en cinco cepas de *P. damsela* subsp. *damsela*: AR78 ( $\Delta dly-hlyA^{pl}$ ), AR64 ( $\Delta dly$ ), AR133 ( $\Delta hlyA^{pl}$ ), AR129 ( $\Delta hlyA^{cr}$ ) y AR119 ( $\Delta dly-hlyA^{cr}$ ) al ser sembradas en la proximidad de un mutante *dly*.

unos pocos centímetros y observamos si se producían fenómenos de sinergia hemolítica. (Figura IV.30). Pudimos comprobar la formación de un mayor halo hemolítico con forma de media luna en la zona parcialmente lisada (zona producida por la acción esfingomielinasa de la Dly). Estos resultados indican que las similitudes estructurales observadas entre HlyA y VCC también se ven plasmadas en los fenómenos de sinergia hemolítica, donde la acción esfingomielinasa de la Dly produce efectos CAMP en HlyA y VCC. También se observaron reacciones CAMP entre *P. damsela* subsp. *damsela* y otras especies bacterianas como *Aeromonas shubertii*, *Streptococcus agalactiae* y *Rhodococcus equi*, siendo estas dos últimas bacterias Gram + las más citadas en trabajos relacionados con reacciones CAMP. La sinergia hemolítica, así como posibles fenómenos de represión entre Dly y HlyA<sup>pl</sup> será estudiada con mayor profundidad en el apartado siguiente.



**Figura IV.30:** Reacciones CAMP entre *P. damsela* subsp. *damsela* RM-71 y *V. cholerae* N16961, *S. agalactiae*, *A. shubertii* y *R. equi*. La reacción CAMP se produce por la interacción de Dly con los “agentes secundarios” producidos por las cuatro especies testadas.

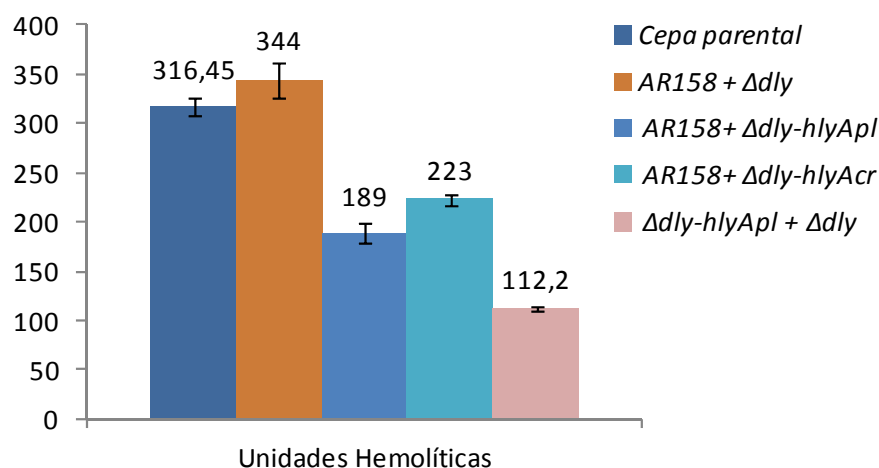
#### 4.5 Dly ejerce un efecto inhibitorio en la actividad de HlyA<sup>pl</sup>

Previamente hemos podido comprobar que la mutación de *hlyA<sup>cr</sup>* (AR129) provoca un descenso significativo en la actividad hemolítica. Sorprendentemente la mutación del gen *dly* en esta cepa ( $\Delta dly$ -*hlyA<sup>cr</sup>*) provoca una recuperación de la actividad hemolítica hasta valores similares a los observados en el mutante  $\Delta dly$  (AR64). Esta situación lleva a pensar en una represión de HlyA<sup>pl</sup> donde Dly parece jugar un papel clave. En primer lugar nos propusimos comprobar si esta represión o inhibición podría ocurrir a nivel extracelular. Para ello, mezclamos ECPs (productos extracelulares) de diferentes mutantes para las tres hemolisinas y llevamos a cabo ensayos de hemólisis en líquido (Figura IV.31). Si la represión no ocurre a nivel extracelular, se esperarían fenómenos de sinergia hemolítica al mezclar los ECPs.

Para realizar este experimento, se mezclaron los ECPs de la cepa AR158 ( $\Delta hlyA^{pl}$ -*hlyA<sup>cr</sup>*), que sólo produce damselisina, con los obtenidos de cepas que producen o bien las dos HlyAs (cepa  $\Delta dly$ ) o bien sólo una de ellas (cepa  $\Delta dly$ -*hlyA<sup>pl</sup>* o cepa  $\Delta dly$ -*hlyA<sup>cr</sup>*). Cuando previamente se ensayó la actividad hemolítica en líquido de los productos

extracelulares de AR158, no se obtuvo hemólisis alguna (Dly no produce una hemólisis total en sangre de oveja). Así, al mezclar los ECPs de dicha cepa con los ECPs procedentes de los diferentes mutantes, las unidades hemolíticas obtenidas son el resultado de fenómenos de sinergia hemolítica derivados de la mezcla de ECPs y no de la actividad hemolítica de la damselisina. Sin embargo, en sangre de rodaballo, rata y ratón, AR158 mostró halos hemolíticos similares a la cepa parental AR57 (Figura IV.21), lo que demuestra que esta cepa produce unos valores normales de Dly.

Como se esperaba, observamos reacciones de sinergia hemolítica en aquellos ensayos donde la damselisina y alguna de las dos HlyAs estaban presentes. Al mezclar los sobrenadantes de la cepa AR158 y la cepa AR64 ( $\Delta dly$ ) (en la mezcla tendríamos Dly + HlyA<sup>cr</sup> y HlyA<sup>pl</sup>) se obtuvieron valores hemolíticos similares a los observados en la cepa parental (AR57), algo esperable ya que la mezcla de dichos sobrenadantes reproduce la composición del sobrenadante de la cepa parental. Al mezclar los sobrenadantes de la cepa AR158 y la cepa AR78 ( $\Delta dly-hlyA^{pl}$ ) (en la mezcla tendríamos Dly + HlyA<sup>cr</sup>) se obtuvieron valores hemolíticos similares a los observados en la cepa AR133 ( $\Delta hlyA^{pl}$ ). Este resultado confirma lo observado en las reacciones CAMP, y pone de manifiesto que entre Dly y HlyA<sup>cr</sup> existe una fuerte sinergia hemolítica. Al mezclar los sobrenadantes de la cepa AR158 y la cepa AR119 ( $\Delta dly-hlyA^{cr}$ ) (en la mezcla tendríamos Dly + HlyA<sup>pl</sup>) se obtuvieron unos elevados valores hemolíticos (223 UH), lo que demuestra claramente que entre Dly y HlyA<sup>pl</sup> también existen fenómenos de sinergia hemolítica y demuestra nuevamente que HlyA<sup>pl</sup> presenta una actividad hemolítica superior a la de HlyA<sup>cr</sup>. Al comparar los valores obtenidos de la mezcla de los sobrenadantes de AR158 y AR119 (223 UH) con los obtenidos del mutante  $\Delta hlyA^{cr}$  (AR129) (1,77 UH), se observa una gran diferencia entre dichos valores, lo que sugiere la existencia de una represión de HlyA<sup>pl</sup>. Dicha represión parece que no ocurre a nivel extracelular, ya que el ensayo de la mezcla de sobrenadantes mostró fenómenos de sinergia, por lo que esta represión debe ocurrir a nivel intracelular. Cuando se mezclaron sobrenadantes de las cepas AR78 ( $\Delta dly-hlyA^{pl}$ ) y AR64 ( $\Delta dly$ ) (en la mezcla tendríamos HlyA<sup>cr</sup> + HlyA<sup>cr</sup> y HlyA<sup>pl</sup>) no se observó un efecto sinérgico ya que los valores obtenidos reflejan un claro efecto aditivo basado en la suma individual de los valores hemolíticos.



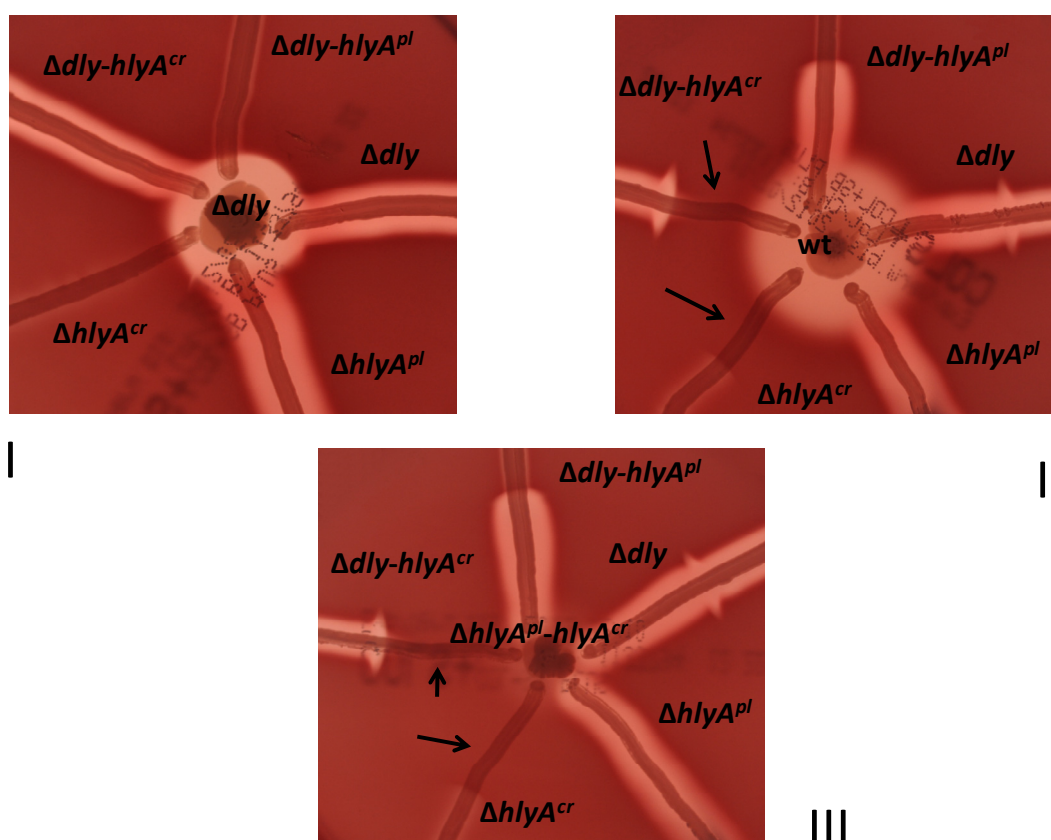
**Figura IV.31:** Ensayos de hemólisis en líquido mezclando productos extracelulares de cepas mutantes simples y dobles de la subsp. *damsela* para las tres hemolisinas: Dly, HlyA<sup>pl</sup> y HlyA<sup>cr</sup> utilizando eritrocitos de oveja. Como cepa productora exclusivamente de Dly se utilizó la cepa AR158 ( $\Delta hlyA^{pl}$ -hlyA<sup>cr</sup>). Los productos extracelulares fueron obtenidos lavando las células con solución salina después de 48 h de incubación en placas de TSA-1 con celofán. Los ensayos de lisis se llevaron a cabo a 25 °C durante 2 h. Cada muestra se obtuvo mezclando 0,5 mL de la mezcla de los productos extracelulares (ajustados previamente a A<sub>630</sub> de 1) y 0,5 mL de la suspensión de eritrocitos (previamente lavados con PBS). Las Unidades Hemolíticas se obtuvieron midiendo a A<sub>540</sub> la hemoglobina liberada (ver materiales y métodos). Se define una Unidad Hemolítica (UH) como la cantidad de hemolisina necesaria para lisar el 50% de los eritrocitos.

Hemos demostrado que la represión de HlyA<sup>pl</sup> no ocurre a nivel extracelular, pero podría ocurrir que la Dly actúe como una señal represora que provoque que HlyA<sup>pl</sup> no sea secretada o bien su expresión sea reprimida a nivel de la región promotora. Para comprobarlo, diseñamos un ensayo que consistió en sembrar la cepa parental en el centro de una placa de agar sangre y tres días después sembrar radialmente desde el exterior hacia el interior de la placa diferentes mutantes, haciéndolos crecer encima de la zona de hemólisis parcial producida por la damselisina. Como resultado pudimos observar distintos fenómenos de sinergia y represión hemolíticas (Figura IV.32).

Al sembrar en el centro de la placa la cepa doble mutante AR158 ( $\Delta hlyA^{cr}$ -hlyA<sup>pl</sup>) se pudieron observar los mismos fenómenos de sinergia y represión obtenidos al sembrar la cepa parental, demostrando que la responsable de originar estos fenómenos hemolíticos es la Dly. La cepa doble mutante  $\Delta dly$ -hlyA<sup>pl</sup> (AR78), que sólo produce HlyA<sup>cr</sup>, es capaz de producir reacciones CAMP únicamente en presencia de la damselisina (Figura IV.32 (I) y (II)). La cepa AR64 ( $\Delta dly$ ), que produce HlyA<sup>pl</sup> y HlyA<sup>cr</sup>, da lugar también a reacciones CAMP en presencia de la damselisina (Figura IV.32 (II)), aunque en menor



medida. Como se expuso anteriormente, este hecho puede ser debido a que la zona de  $\beta$ -hemólisis no CAMP oscurece parcialmente la reacción CAMP. Nuevamente, no se observó reacción CAMP en presencia de la damselisina (Figura IV.32 (I)). El mutante  $\Delta hlyA^{pl}$  (AR133) produce damselisina, por lo que no se producen reacciones CAMP en ninguno de los casos (Figura IV.32 (I), (II) y (III)). El mutante  $\Delta hlyA^{cr}$  (AR129), que ya presenta represión mediada por la damselisina, muestra una represión más drástica en presencia de damselisina exógena (Figura IV.32 (II) y (III)), lo que demuestra que AR129, aunque en pequeñas cantidades, es capaz de producir  $HlyA^{pl}$  que es reprimida por completo por la presencia de damselisina exógena.



**Figura IV.32:** Reacciones CAMP y represión de  $HlyA^{pl}$  en *P. damsela* subsp. *damsela*. Se sembraron con la base de un hisopo de madera en el centro de una placa de agar sangre las cepas: (I) mutante  $\Delta dly$  (AR64), (II) cepa parental (AR57) y (III) doble mutante  $\Delta hlyA^{cr}-hlyA^{pl}$  (AR158). Después de tres días de crecimiento se sembraron radialmente desde fuera hacia dentro las cepas: (A)  $\Delta dly-hlyA^{pl}$  (AR78), (B)  $\Delta dly$  (AR64), (C)  $\Delta hlyA^{pl}$  (AR133), (D)  $\Delta hlyA^{cr}$  (AR129) y (E)  $\Delta dly-hlyA^{cr}$  (AR119). Las imágenes se tomaron 15 h más tarde. Las flechas negras señalan la zona de represión de la  $HlyA^{pl}$ .

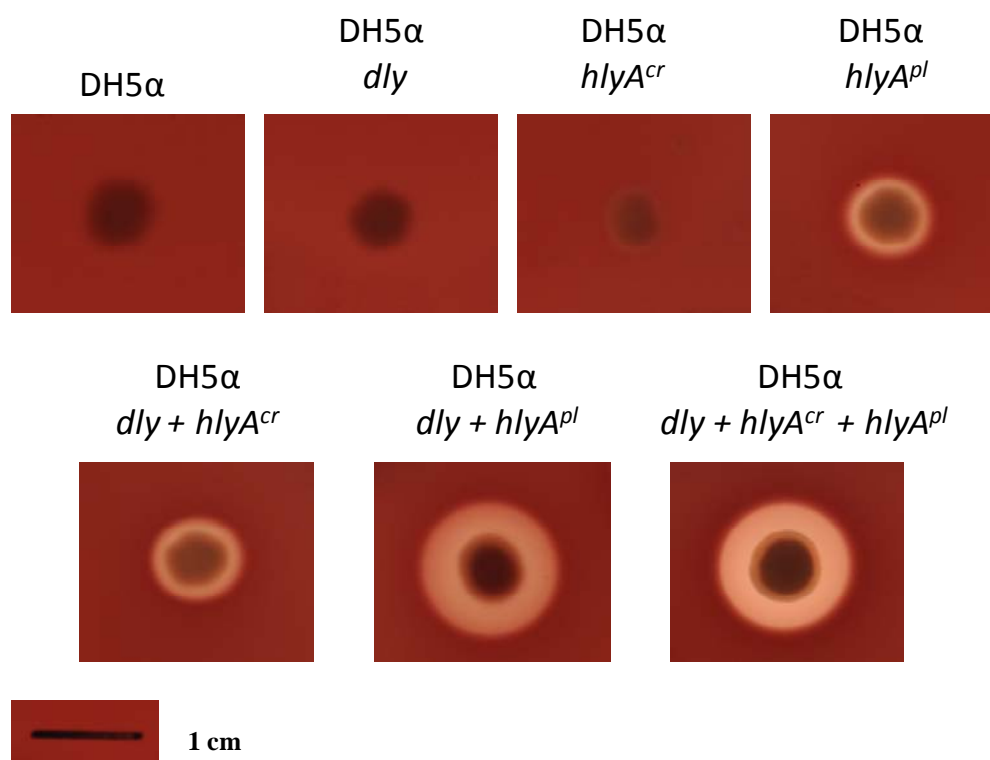
La represión mediada por la damselisina es claramente más patente en el mutante  $\Delta dly-hlyA^{cr}$  (AR119) (Figura IV.32 (II) y (III)), ya que solamente se aprecia hemólisis en la zona que no está en contacto con la zona parcialmente lisada. Curiosamente, una pequeña reacción CAMP se puede apreciar en el borde de la zona parcialmente lisada. Este efecto sinérgico podría ser derivado de la interacción de la damselisina con moléculas de  $HlyA^{pl}$  que fueron secretadas antes de que la represión tuviese lugar. Como se esperaba, no se observaron represiones en ausencia de la damselisina (Figura IV.32 (I)). A partir de estos resultados podemos concluir que la represión de la  $HlyA^{pl}$  por parte de la damselisina no ocurre a nivel extracelular, y sí ocurre a nivel intracelular o de la membrana plasmática siempre y cuando  $HlyA^{cr}$  no esté presente. Esto sugiere que la represión mediada por la damselisina puede ocurrir a nivel transcripcional, de maduración o de secreción. En apartados posteriores intentaremos dilucidar si esta represión ocurre a nivel transcripcional.

#### 4.6 Clonación de los genes *dly*, *hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>* en *E. coli*

Se clonó cada uno de los genes de las hemolisinas Dly,  $HlyA^{pl}$  y  $HlyA^{cr}$  en los plásmidos pWKS30, pACYC184, y pHRP309 dentro de la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*. Las cepas resultantes se sembraron en placas de agar sangre con el fin de observar el fenotipo hemolítico que aportaban las hemolisinas a *E. coli*, primero individualmente y posteriormente en diversas combinaciones entre ellas (Figura IV.33).

El gen *dly* clonado en *E. coli* (DH5 $\alpha$ -*dly*) apenas produjo hemólisis, algo esperable ya que la Dly presenta una baja actividad hemolítica frente a eritrocitos de oveja. Cuando clonamos el gen *hlyA<sup>cr</sup>* en *E. coli* (DH5 $\alpha$ -*hlyA<sup>cr</sup>*) pudimos observar un pequeño halo de hemólisis. En el caso de *hlyA<sup>pl</sup>* (DH5 $\alpha$ -*hlyA<sup>pl</sup>*) pudimos observar un halo hemolítico mayor con respecto a DH5 $\alpha$ -*hlyA<sup>cr</sup>*. Esta diferente actividad hemolítica en *E. coli* confirma los resultados obtenidos en los ensayos de hemólisis en líquido, donde pudimos apreciar una mayor actividad hemolítica en las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* que secretaban  $HlyA^{pl}$ , con respecto a aquellas que solo secretaban  $HlyA^{cr}$ . Esta situación se repitió nuevamente cuando a las cepas de *E. coli* que contenían *hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>* se les introdujo el gen *dly* (DH5 $\alpha$ -*dly-hlyA<sup>cr</sup>* y DH5 $\alpha$ -*dly-hlyA<sup>pl</sup>*). En ambas cepas se pudo observar un aumento significativo de la actividad hemolítica, siendo nuevamente más patente en la cepa de *E. coli* que contenía los genes *dly* y *hlyA<sup>pl</sup>*. Pero en ambos

casos se pone de manifiesto la existencia de fenómenos de sinergia hemolítica entre Dly y las dos HlyAs. Curiosamente al clonar las tres hemolisinas dentro de *E. coli* (DH5 $\alpha$ -*dly*-*hlyA<sup>pl</sup>*-*hlyA<sup>cr</sup>*) se obtuvo un halo de tamaño similar al observado en la *E. coli* que contenía los genes *dly* y *hlyA<sup>pl</sup>*. La similitud del tamaño de dichos halos puede deberse a que las hemolisinas probablemente hayan alcanzado la máxima difusión posible en las placas de agar sangre. Sin embargo, pudimos apreciar que la cepa de *E. coli* que portaba las tres hemolisinas mostró un halo hemolítico más translúcido que el halo mostrado por la cepa de *E. coli* que contenía los genes *dly* y *hlyA<sup>pl</sup>*, que resultó ser más turbio. Este dato pone de manifiesto que la hemólisis en *P. damsela* subsp. *damsela* es el resultado de la interacción de las tres hemolisinas: Dly, HlyA<sup>pl</sup> y HlyA<sup>cr</sup>.

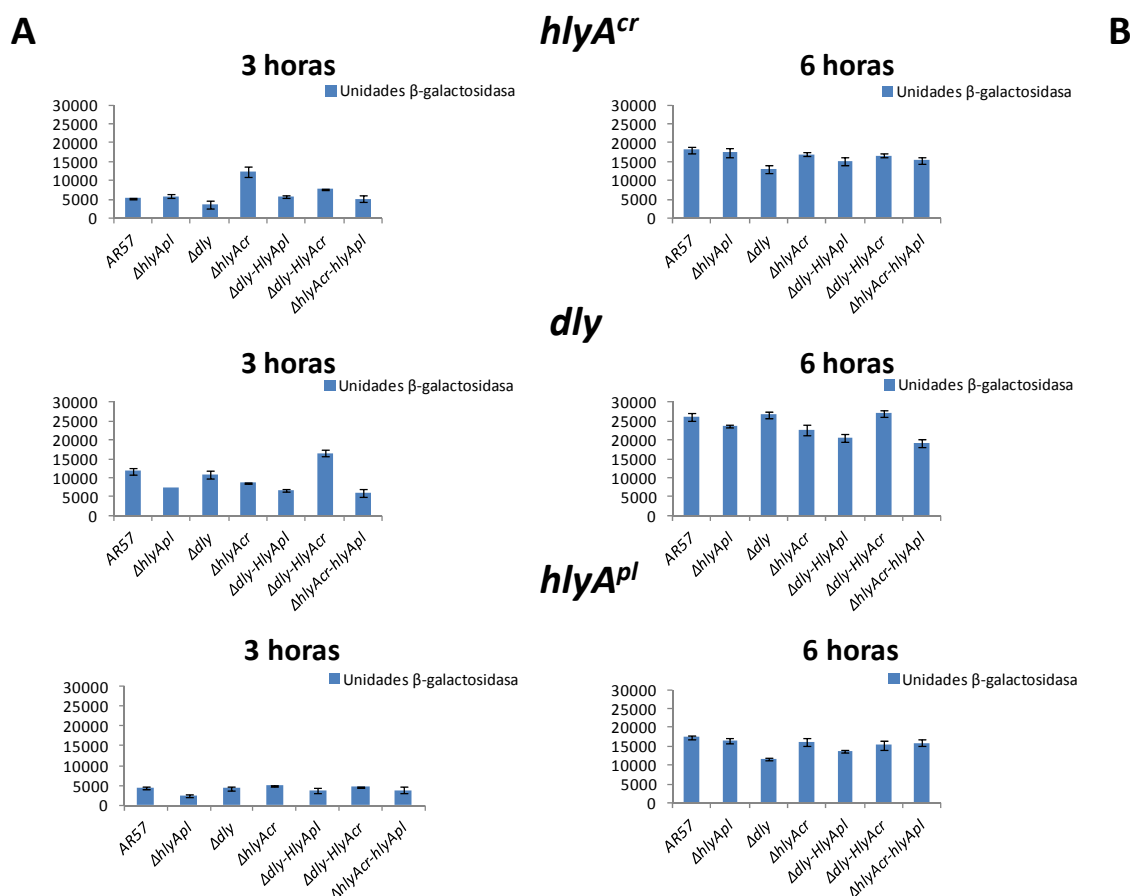


**Figura IV.33:** Ensayos de actividad hemolítica en *E. coli* DH5 $\alpha$  con los genes *dly*, *hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>* que codifican las tres hemolisinas de la cepa RM-71 clonados en los plásmidos pWKS30, pACYC184, y pHRP309 y en combinaciones simples, dobles y triple. Se incubaron a 25 °C durante 48 h. La barra de escala representa 1 cm.

#### 4.7 Regulación transcripcional de los genes *dly*, *hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>*

Hasta el momento sabemos que cuando *hlyA<sup>cr</sup>* se halla deletado, la presencia extracelular de Dly induce una represión de HlyA<sup>pl</sup>, que ocurre a nivel intracelular. Para descartar que esta represión ocurra a nivel transcripcional, llevamos a cabo fusiones transcripcionales con el gen *lacZ* en el plásmido pHRP309. Nuestro propósito era definir las actividades promotoras de las tres hemolisinas en sus diferentes mutantes simples y dobles, con el fin de determinar si la delección de uno o dos de los genes *dly*, *hlyA<sup>cr</sup>* y *hlyA<sup>pl</sup>* provocaba una represión a nivel transcripcional de HlyA<sup>pl</sup>. Como control negativo se utilizó la cepa AR57 portando el plásmido pHRP309 sin ningún promotor clonado, cepa que no mostró actividad  $\beta$ -galactosidasa alguna. Los cultivos se realizaron en medio LB, y la actividad  $\beta$ -galactosidasa se midió a dos tiempos diferentes: 3 h y 6 h después de la inoculación. Como resultado se obtuvieron diferentes patrones de expresión. A las 3 h se observó una baja expresión promotora en las tres hemolisinas (Figura IV.34), sin embargo, a las 6 h los tres promotores mostraron unos niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa sensiblemente mayores, lo que sugiere que la expresión de los genes *dly*, *hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>* es dependiente de la fase de crecimiento en que se encuentre la bacteria.

No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión para cada gen individual en ninguna de las cepas testadas, pero sí se observaron diferencias en los niveles de expresión entre los promotores de las tres hemolisinas, ya que el promotor del gen *dly* alcanzó los valores más altos (26.000 unidades  $\beta$ -galactosidasa) seguido por el promotor del gen *hlyA<sup>cr</sup>* (18.000 unidades  $\beta$ -galactosidasa) y por último, el gen *hlyA<sup>pl</sup>* (17.000 unidades  $\beta$ -galactosidasa). Estos resultados muestran que no existe represión a nivel transcripcional del gen *hlyA<sup>pl</sup>* en el mutante  $\Delta hlyA<sup>cr</sup>$  (AR129), ya que su promotor muestra unos valores  $\beta$ -galactosidasa normales. Por lo tanto la represión/inhibición ejercida sobre HlyA<sup>pl</sup> debe ocurrir a nivel traduccional o bien a nivel de interacción con la proteína.



**Figura IV.34:** Análisis transcripcional de los promotores de los genes *dly*, *hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>* mediante fusiones con el gen *lacZ* en el plásmido pHRP309. Las barras indican valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa medidas a partir de cultivos en medio LB suplementado con gentamicina (50  $\mu\text{g/mL}$ ) a las 3 h (A) y a las 6 h (B). Las actividades  $\beta$ -galactosidasa fueron medidas en la cepa parental AR57 y en los mutantes simples y dobles para los genes *dly*, *hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>*.

#### **4.7.1 Los genes *dly*, *hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>* se hallan regulados a nivel transcripcional por factores ambientales como la concentración salina o la disponibilidad de hierro**

Dado que se habían observado fenómenos de regulación en los que la presencia o la ausencia de las hemolisinas parecía jugar un papel importante, nos propusimos comprobar si factores ambientales como la concentración salina o el déficit de hierro actúan como reguladores de la expresión hemolítica.

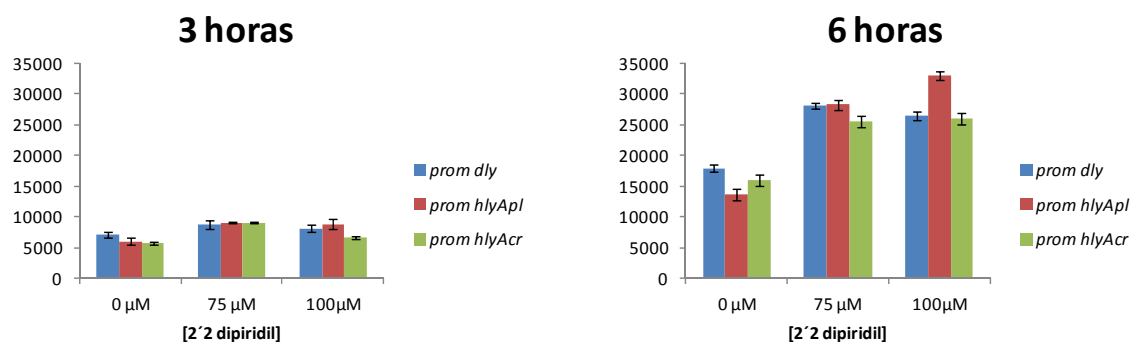
Para comprobar el efecto que ejerce la concentración de hierro en la regulación transcripcional de las tres hemolisinas, evaluamos los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa en condiciones de déficit y exceso de hierro (Figura IV.35 (A)),

realizándose dos mediciones, a las 3 h y a las 6 h. Para obtener condiciones de déficit de hierro los cultivos se crecieron en medio LB bajo tres concentraciones diferentes del quelante 2,2'-dipiridil (0, 75 y 100  $\mu$ M). Los resultados indican nuevamente que existen unos bajos niveles de expresión a las 3 h, independientemente de la disponibilidad de hierro en el medio. En cambio, a las 6 h se pudo apreciar un incremento generalizado en los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa, si bien este incremento fue significativamente mayor al añadir al medio 2,2'-dipiridil a una concentración 75  $\mu$ M. Estos resultados muestran que la baja disponibilidad de hierro en el medio provoca un incremento de la expresión de los genes *dly*, *hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>*.

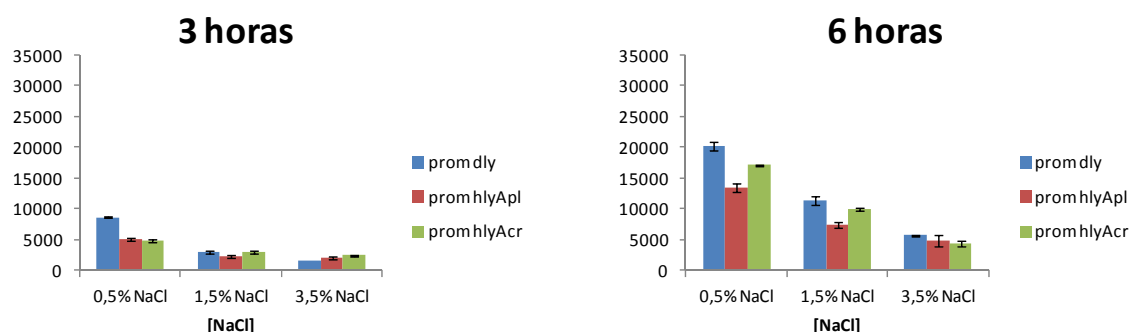
Estudios previos demostraron que un medio de cultivo que contenga una concentración del ion  $\text{Na}^+$  superior o igual al 0,8% reduce significativamente la producción de damselisina (Kreger, 1984). Por ello, nos propusimos investigar si la concentración de NaCl también podría actuar como un factor medioambiental que regule la expresión de los genes *dly*, *hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>*. Para ello, evaluamos la actividad promotora bajo tres concentraciones crecientes de NaCl y a dos tiempos diferentes, a las 3 y a las 6 h en la cepa parental AR57 (Figura IV.35 (B)). De manera similar a las condiciones analizadas anteriormente, en las mediciones a las 3 h posteriores a la inoculación se obtuvieron unos valores de  $\beta$ -galactosidasa bajos en las tres concentraciones de NaCl, si bien en la concentración de NaCl más baja se observó una mayor expresión génica. Esta tendencia se corroboró a las 6 h posteriores a la inoculación, donde se confirmó que la expresión de las tres hemolisinas es inversamente proporcional a la concentración de NaCl del medio.

Estos estudios a nivel transcripcional demuestran que la expresión de los genes *dly*, *hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>* depende de la fase de crecimiento, y de las concentraciones de hierro y NaCl disponibles en el medio.

## A Efecto de la disponibilidad de hierro



## B Efecto de la concentración de NaCl

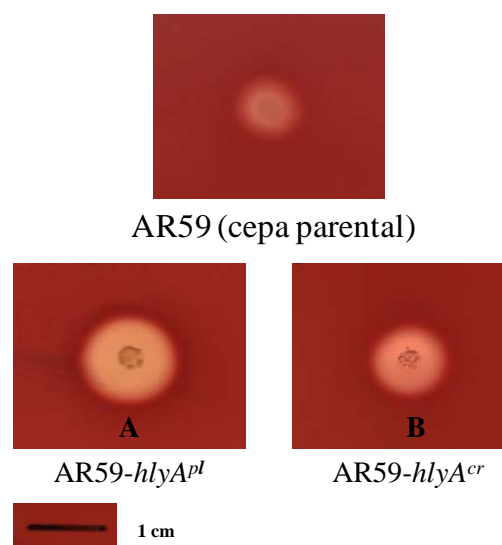


**Figura IV.35:** Análisis transcripcional de los promotores de los genes *dly*, *hlyA<sup>dl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>* mediante fusiones con el gen *lacZ* en el plásmido pHRP309. Las barras indican valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa medidas en medio LB suplementado con gentamicina (50  $\mu$ g/mL) a las 3 h y a las 6 h, bajo dos condiciones diferentes: (A) tres concentraciones crecientes del agente quelante de hierro 2,2'-dipiridil, y (B) tres concentraciones crecientes de NaCl. Las actividades  $\beta$ -galactosidasa fueron medidas en la cepa parental AR57.

#### 4.8 La cepa tipo de *P. damsela* subsp. *damsela* ATCC 33539 muestra un fenotipo hemolítico intermedio

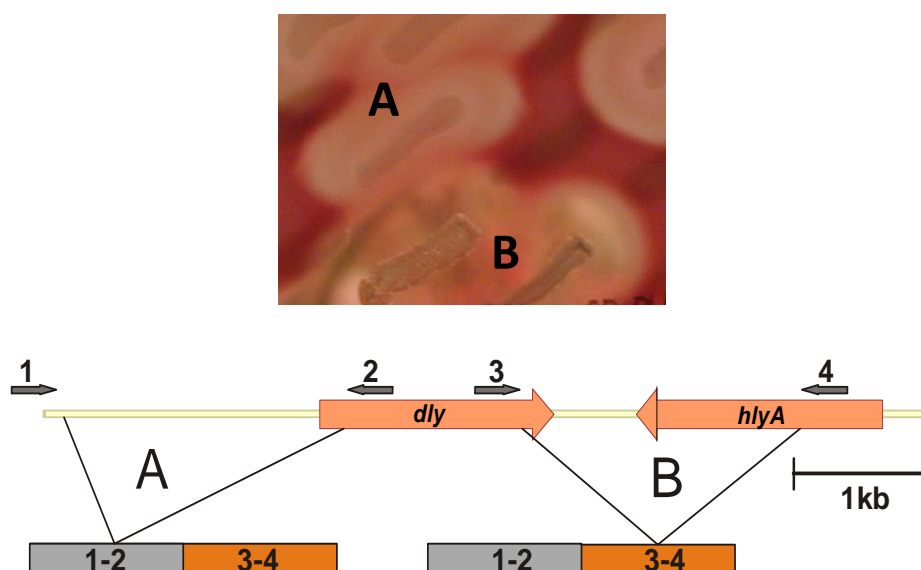
En el capítulo anterior vimos que la cepa ATCC 33539 de *P. damsela* subsp. *damsela* posee el plásmido pPHDD1 pero su actividad hemolítica es significativamente menor que el resto de las cepas que poseen dicho plásmido. Dado que la cepa ATCC 33539 es capaz de producir el halo de hemólisis parcial característico de aquellas cepas que producen damselisina, nos planteamos complementar dicha cepa con los genes *hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>* con el objetivo de determinar si alguna mutación puntual en ambos o alguno de los dos genes es la causa de tan baja actividad hemolítica. Para ello, seleccionamos una cepa mutante espontánea para rifampicina (AR59), que complementamos con los genes *hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>* de la cepa RM-71 (esta cepa no presenta ningún tipo de alteración en la actividad hemolítica). Como resultado, pudimos comprobar que la complementación de la cepa AR59 con cualquiera de los genes *hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>* de la cepa RM-71 resultó en un restablecimiento (Figura IV.36A y B) del fenotipo hemolítico típico de las cepas que presentan el plásmido pPHDD1.

Con el fin de identificar posibles mutaciones puntuales, comparamos las secuencias de HlyA<sup>pl</sup> y HlyA<sup>cr</sup> entre las cepas RM-71 y ATCC 33539. En las secuencias de HlyA<sup>cr</sup> encontramos 5 cambios, de los cuales tres no eran conservativos, mientras que en HlyA<sup>pl</sup> encontramos 3 cambios puntuales, todos conservativos. Debido a la existencia de varios cambios puntuales no pudimos identificar directamente qué cambio podría ser el responsable de la disminución de la actividad hemolítica.



**Figura IV.36:** Complementación de la cepa AR59 (ATCC 33539 resistente a rifampicina) con los genes *hlyA<sup>pl</sup>* (A) y *hlyA<sup>cr</sup>* (B) de la cepa RM-71 en agar sangre de oveja después de 15 h a 25 °C. La barra de escala representa 1 cm.





**Figura IV.37:** Representación de los eventos de recombinação que podrían tener lugar durante la construcción de un mutante para el gen *dly* en la cepa AR59. Se obtiene una recuperación de la actividad hemolítica (opción B) cuando el plásmido suicida recombina en la región 3-4 que abarca un fragmento de la secuencia de *hlyA<sup>pl</sup>*. En cambio cuando se inserta en la región 1-2 (opción A) no se obtiene recuperación de la actividad hemolítica. Las flechas grises y los números hacen referencia al cebador y la dirección de amplificación de los fragmentos 1-2 y 3-4.

Sin embargo, durante la construcción por intercambio alélico del mutante del gen *dly* en la cepa de *P. damsela* subsp. *damsela* AR59 (ATCC 33539 resistente a rifampicina), pudimos observar que algunos clones que presentaban la primera inserción del plásmido suicida, mostraban una actividad hemolítica similar a la presentada por la cepa RM-71 (Figura IV.37B). Este hecho podría explicarse por que la secuencia utilizada para la construcción del mutante *dly* procede de la cepa RM-71 (la cual carece de mutaciones en *hlyA<sup>pl</sup>*), y al recombinar en la cepa AR59 en la región donde se halla la secuencia de la *hlyA<sup>pl</sup>*, se obtiene una recuperación del fenotipo hemolítico que presentan las cepas que contienen pPHDD1.

Debido a que la mutación que restablece el fenotipo hemolítico solo puede estar en la secuencia del gen *hlyA<sup>pl</sup>* comprendida en el segmento 3-4 de la construcción génica para mutar el gen *dly*, decidimos comparar nuevamente la secuencia de aminoácidos englobada en la región 3-4. Además en esta comparativa introdujimos la secuencia de otra cepa de *P. damsela* subsp. *damsela* que muestra un fenotipo similar a la cepa

ATCC 33539. Dicha cepa, denominada H011004020, fue cedida por el Dr. J. J. Borrego de la Universidad de Málaga (Figura IV.38).

Los resultados indican que existe una única diferencia entre la secuencia de aminoácidos en la HlyA de la cepa ATCC 33539 con respecto a la secuencia de la HlyA de la cepa RM-71. Dicho cambio provoca la sustitución de una serina por una alanina y dado que este cambio también es compartido por la cepa H011004020, podría ser el causante de las diferencias observadas en la actividad hemolítica.

**>Secuencia HlyA pPHDD1**

RNSLIWDRGSRSECKNGNISLIYQVILERSLSFGTNGVATPDAKIVRISLDDNTTGAGIHLNDTLTHKSYWANYQWSGW  
AREWSASAIAQDYLFDISTNEKAQLKTFPRENINSNYNINESSGFTIGVTGAEVSKDGPKASLQASASYSQSKSLFNT  
QDYRVEKNSTSAQNVSFWAREQYPNSELDDKWTNPVWSEDPANLKKVQPLSYASFVPKLDVIYKASPNETGKTQF  
TIDSSVNIMPLYNRAWFYFYGVGAHQTYGVDDQPLRRVNKAISFTVDWEHPVFTGGTPVNIQLASFNNKCMDIQNK  
**G**IVMTAECDINSKSQSFYDQYNRYVSATNTKLCLDGESLSELPKSLKLTQKWLWDGDKLKNSEFKYLTDFDNTFLE  
**S**LSNKKQLNSSYTRVFDSTIN

**>Secuencia HlyA ATCC 33539**

RNSLIWDRGSRSECKNGNISLIYQVILERSLSFGTNGVATPDAKIVRISLDDNTTGAGIHLNDTLTHKSYWANYQWSGW  
AREWSASAIAQDYLFDISTNEKAQLKTFPRENINSNYNINESSGFTIGVTGAEVSKDGPKASLQASASYSQSKSLFNT  
QDYRVEKNSTSAQNVSFWAREQYPNSELDDKWTNPVWSEDPANLKKVQPLSYASFVPKLDVIYKASPNETGKTQF  
TIDSSVNIMPLYNRAWFYFYGVGAHQTYGVDDQPLRRVNKAISFTVDWEHPVFTGGTPVNIQLASFNNKCMDIQNK  
GIVMTAECDINSKSQSFYDQYNRYVSATNTKLCLDGESLSELPKSLKLTQKWLWDGDKLKNSEFKYLTDFDNTFLE  
**A**LSNKKQLNSSYTRVFDSTINK

**>Secuencia HlyA H011004020**

RNSLIWDRGSRSECKNGNISLIYQVILERSLSFGTNGVATPDAKIVRISLDDNTTGAGIHLNDTLTHKSYWANYQWSGW  
AREWSASAIAQDYLFDISTNEKAQLKTFPRENINSNYNINESSGFTIGVTGAEVSKDGPKASLQASASYSQSKSLFNT  
QDYRVEKNSTSAQNVSFWAREQYPNSELDDKWTNPVWSEDPANLKKVQPLSYASFVPKLDVIYKASPNETGKTQF  
TIDSSVNIMPLYNRAWFYFYGVGAHQTYGVDDQPLRRVNKAISFTVDWEHPVFTGGTPVNIQLASFNNKCMDIQNK  
**E**IVMTAECDINSKSQSFYDQYNRYVSATNTKLCLDGESLSELPKSLKLTQKWLWDGDKLKNSEFKYLTDFDNTFLE  
**A**LSNKKQLNSSYTRVFDSTIN

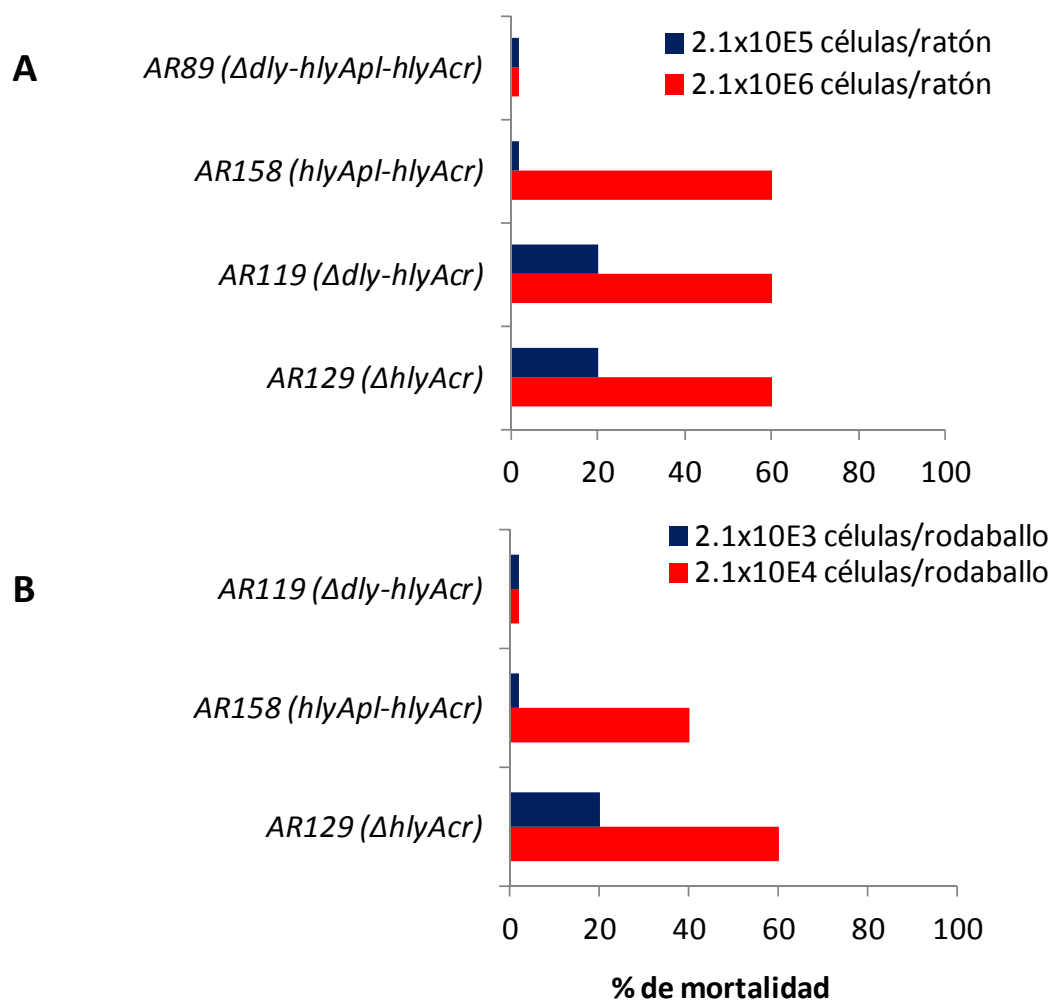
**Figura IV.38:** Análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos de la proteína HlyA<sup>pl</sup> comprendidas en la región 3-4 de la construcción génica para mutar el gen *dly*. Se utilizaron las cepas RM-71, ATCC 33539, y H011004020. Se muestra en rojo los cambios puntuales entre secuencias.

#### 4.9 Papel de HlyA<sup>cr</sup> en la virulencia para ratón y rodaballo

En el apartado anterior hemos evaluado el papel que juegan Dly y HlyA<sup>pl</sup> en la virulencia de *P. damsela* subsp. *damsela* para ratón y rodaballo. Debido al descubrimiento de una segunda HlyA codificada en el cromosoma (*hlyA<sup>cr</sup>*), decidimos evaluar el papel de HlyA<sup>cr</sup> en la capacidad de *P. damsela* subsp. *damsela* para causar la muerte en ratón mediante inoculación intravenosa a través de la cola, utilizando dos dosis de  $2,1 \times 10^6$  y  $2,1 \times 10^5$  ufc por ratón. Los ratones murieron entre 12 y 48 h postinfección y se recuperaron cultivos puros de *P. damsela* subsp. *damsela* a partir de los órganos internos como riñón o hígado de los ratones infectados. El mutante  $\Delta hlyA^{cr}$  (AR129) causó un 60% de mortalidad en la dosis alta y un 20% en la dosis baja (Figura IV.39). Al mutar sobre esta cepa el gen *dly*, dando lugar al doble mutante  $\Delta dly-hlyA^{cr}$  (AR119), observamos que dicha cepa produjo los mismos resultados en el grado de virulencia, un 60% de mortalidad en la dosis alta y un 20% en la dosis baja. La similitud en la virulencia mostrada por ambas cepas pone de manifiesto la existencia de una represión de HlyA<sup>pl</sup> en la cepa AR129 ( $\Delta hlyA^{cr}$ ) que desaparece en la cepa AR119 ( $\Delta dly-hlyA^{cr}$ ) donde la pérdida de la virulencia provocada por la delección de *dly* es compensada por el restablecimiento de la producción de HlyA<sup>pl</sup>. El doble mutante  $\Delta hlyA^{pl}-hlyA^{cr}$  (AR158) produjo un 60% de mortalidad en la dosis alta y no causó mortalidades en la dosis baja. Este porcentaje es algo más bajo que en el caso de la cepa AR129 ( $\Delta hlyA^{cr}$ ) que causó un 20% de mortalidad en la dosis baja. Estas diferencias pueden derivar de las pequeñas cantidades de HlyA<sup>pl</sup> que aún produce la cepa AR129 ( $\Delta hlyA^{cr}$ ). No se registró mortalidad alguna en el triple mutante  $\Delta dly-hlyA^{pl}-hlyA^{cr}$  (AR89) en ninguna de las dosis ensayadas. Estos resultados demuestran que HlyA<sup>cr</sup>, y principalmente Dly y HlyA<sup>pl</sup>, son necesarias para provocar mortalidades en ratón, y los valores más altos de virulencia sólo se alcanzan por medio de interacciones de tipo sinérgico entre las tres hemolisinas.

Nuevamente, como *P. damsela* subsp. *damsela* es un organismo patógeno de animales marinos, decidimos estudiar el efecto que produce la delección de *hlyA<sup>cr</sup>* en la virulencia para rodaballo mediante inoculación intraperitoneal utilizando dos dosis de  $2,1 \times 10^4$  y  $2,1 \times 10^3$  ufc por pez. Los peces murieron entre 24 y 72 h después de la infección, y se recuperaron cultivos puros de *P. damsela* subsp. *damsela* de los

riñones de los rodaballos infectados. El mutante  $\Delta hlyA^{cr}$  (AR129) mostró un significativo descenso en la virulencia causando un 60% de mortalidad en la dosis alta y un 20% en la dosis baja (Figura IV.39). Utilizando la cepa AR158 (doble mutante  $\Delta hlyA^{cr}-hlyA^{pl}$ ) el descenso fue más acusado, registrándose únicamente un 40 % de mortalidad en la dosis más alta. La cepa doble mutante  $\Delta dly-hlyA^{cr}$  (AR119) no produjo mortalidad con ninguna de las dosis utilizadas. Estos resultados ponen de manifiesto que HlyA presenta una diferente especificidad a nivel de hospedador. La cepa AR119 ( $\Delta dly-hlyA^{cr}$ , sólo produce HlyA<sup>pl</sup>) provocó unos porcentajes de mortalidad sensiblemente mayores en ratón comparados con los obtenidos en rodaballo, donde no se registró mortalidad alguna. Esta situación, aunque en menor medida, también se observó con la cepa AR78 ( $\Delta dly-hlyA^{pl}$ ), que sólo produce HlyA<sup>cr</sup>, y que también resultó ser más virulenta para ratón que para rodaballo. En el caso de Dly, la cepa AR158 ( $\Delta hlyA^{cr}-hlyA^{pl}$ , sólo produce Dly) resultó ser igualmente virulenta para rodaballo y para ratón, mostrando unos porcentajes de mortalidad similares en ambos ensayos. Estos resultados demuestran que las tres hemolisinas Dly, HlyA<sup>pl</sup> y HlyA<sup>cr</sup> son factores de virulencia imprescindibles durante el desarrollo de la infección provocada por *P. damselae* subsp. *damselae*. Nuestros ensayos muestran claramente la necesidad e importancia de los fenómenos de sinergia observados entre las tres hemolisinas para que *P. damselae* subsp. *damselae* pueda alcanzar el mayor grado de virulencia, tanto en peces como en mamíferos.



**Figura IV.39:** Ensayos de virulencia en ratón (A) y en rodaballo (B) con cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* utilizando dos dosis diferentes. Los resultados se muestran como porcentajes de mortalidad.



## V. Discusión





Las subespecies *damselae* y *piscicida* de la especie *Photobacterium damselae* presentan un conjunto de características fenotípicas diferenciales que permiten distinguirlas fácilmente. En este trabajo nos hemos propuesto arrojar algo de luz sobre la base genética de estas diferencias fenotípicas, con especial énfasis en lo que se refiere a la captación de hierro en ambas subespecies y la producción de hemolisinas en la subespecie *damselae*.

### **Captación de hierro y diversidad genética en *P. damselae***

Cuando una bacteria patógena entra en el organismo hospedador, se encuentra con una muy baja o prácticamente nula disponibilidad de hierro libre. La adquisición de hierro es un factor limitante en el crecimiento y supervivencia de una bacteria durante el proceso infectivo (Jurado, 1997). El estudio de los genes implicados en la captación de hierro y sus respectivas proteínas, sobre todo las de membrana externa, tiene un especial interés para estudios de patogenicidad, diagnóstico y desarrollo de vacunas (Magariños *et al.*, 1992).

Los ensayos con medio CAS en placa y en líquido nos permitieron confirmar que todas las cepas de *P. damselae* producen sideróforos. A partir del ensayo de titulación de Fur identificamos una serie de genes implicados tanto en el metabolismo general y control de los niveles intracelulares del mismo, como en la captación de hierro. En el primer grupo se incluyen las ferritinas, flavodoxinas, superóxido dismutasas, formiato deshidrogenasas, tiotransferasas y tiorredoxinas. Todas ellas presentan la capacidad de incluir átomos de hierro en su estructura o, como en el caso de la ferritina, almacenarlo. Estas proteínas participan en el control de los niveles intracelulares de hierro. La concentración de hierro intracelular está sometida a un control muy estricto ya que en su forma reducida ( $\text{Fe}^{+2}$ ) provoca la reducción parcial del oxígeno generando la aparición de radicales hidroxilo, los cuales son altamente perjudiciales para la integridad celular (Clarke *et al.*, 2001).

En el segundo grupo se incluyen diversos genes relacionados con la captación de grupos hemo, sideróforos, ión  $\text{Fe}^{+2}$ , y un gen de una O-metiltransferasa que podría estar involucrada en la síntesis de sideróforos. Con respecto al transporte de sideróforos hemos encontrado un gen que codifica una ATPasa perteneciente a un

transportador ABC implicado en el transporte de  $\text{Fe}^{+3}$  a través de la membrana interna y un gen homólogo a *fhuE* que podría estar involucrado en el transporte del sideróforo producido por *P. damsela* subsp. *damsela*. Dentro de los genes relacionados con la captación del grupo hemo se incluyen homólogos previamente identificados en *P. damsela* (Río *et al.*, 2005). Estudios previos ya habían demostrado la importancia de la utilización del grupo hemo en *P. damsela* subsp. *piscicida* (Magariños *et al.*, 1994b; Magariños *et al.*, 1996b).

En base a estos resultados, se profundizó en el papel que juegan el gen de la O-metiltransferasa y *fhuE* en *P. damsela*. Homólogos del gen de la O-metiltransferasa se pueden encontrar formando parte de operones de policétido sintetasas. Estas enzimas están involucradas en la producción de metabolitos secundarios como antibióticos o pigmentos, así como en la producción de sideróforos (Omura *et al.*, 2001). Las metiltransferasas, además, las podemos encontrar formando parte de péptido sintetasas no ribosómicas, como es el caso de la síntesis del sideróforo pioquelina en *Pseudomonas aeruginosa* (Patel & Walsh, 2001). *Legionella pneumophila*, si bien no produce sideróforos, codifica una metiltransferasa requerida para la asimilación del hierro, infección intracelular y virulencia (Pope *et al.*, 1996; Viswanathan *et al.*, 2000). En un análisis de genes regulados por hierro y/o Fur mediante *microarrays* en *V. cholerae*, se encontró asimismo una O-metiltransferasa regulada negativamente por hierro y Fur (Mey *et al.*, 2005).

El análisis de la capacidad de crecimiento en déficit de hierro, así como la medición de los niveles de producción de sideróforos mediante ensayos de CAS sobrenadante mostró que estos dos genes no son esenciales en los mecanismos de captación de hierro mediante sideróforos en *P. damsela* subsp. *damsela*. La falta de un fenotipo claro en los mutantes podría explicarse por la existencia de genes alternativos que suplan a los delecionados o bien la existencia de copias de los mismos. Los datos de las fusiones transcripcionales demostraron claramente por vez primera que el promotor del gen de la O-metiltransferasa está regulado negativamente por la concentración de hierro en el medio, y dicha regulación está ejercida por la proteína represora Fur. Hemos contribuido por tanto a demostrar que los genes de las O-metiltransferasas bacterianas deben considerarse como integrantes del regulón Fur.

Trabajos previos sugieren que los sideróforos producidos por cada subespecie de *P. damsela* muestran una diferente naturaleza química (Fouz *et al.*, 1997; Magariños *et al.*, 1994b), lo que conlleva la existencia de diferencias genotípicas. Para encontrar dichas diferencias, llevamos a cabo un ensayo de hibridación sustractiva, que permite la identificación de genes específicos de una cepa (Rosok & Sioud, 2007). Nuestros resultados no permitieron identificar claramente ningún gen relacionado con la síntesis de sideróforos. Esto sugiere que, o bien las diferencias a nivel genético son muy pequeñas, o nuestro ensayo no fue lo suficientemente representativo como para abarcar dichos genes.

Mediante este ensayo de hibridación sustractiva identificamos un elevado número de genes de transposasas específicos de la subespecie *piscicida*, ya identificados en trabajos previos de nuestro laboratorio (Juiz-Río *et al.*, 2005). Sin embargo en la subsp. *damsela* no pudimos observar la presencia de genes diferenciales de transposasas con respecto a la subsp. *piscicida*. El ingente número de transposasas en la subsp. *piscicida* puede haber jugado un papel en la reducción o silenciamiento de sus genes, conllevando la pérdida de determinados fenotipos que sí están presentes en la subsp. *damsela*. Esta idea se ve apoyada por el mayor número de genes diferenciales presentes en la subsp. *damsela*, estando varios de ellos relacionados con las diferencias fenotípicas observadas entre ambas subespecies. Además, en nuestro laboratorio hemos comprobado que las cepas de la subsp. *piscicida* presentan dificultades para crecer en un medio mínimo. Esto podría ser debido a auxotrofías causadas por la inserción de genes de transposasas en genes biosintéticos.

También se aislaron genes relacionados con plásmidos, lo que sugiere que el contenido plasmídico entre ambas subespecies es diferente. El número de genes de naturaleza plasmídica exclusivos de la subsp. *piscicida* fue el doble (10 frente a 5) del obtenido en la subsp. *damsela*. También hemos podido observar de forma diferencial en ambas subespecies genes relacionados con fagos. Los fagos, al transferir su ADN a la célula hospedadora, contribuyen a la adquisición de nuevos genes como por ejemplo exotoxinas que aumentan la patogenicidad bacteriana. Esta transferencia de ADN, que

ocurre en ambientes marinos, y también en el intestino de animales y en el humano, juega un papel muy importante en la virulencia bacteriana (Casas & Maloy, 2011).

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos para resistir los efectos tóxicos de antibióticos u otras drogas. Las bombas de flujo multirresistentes (*Multidrug efflux pumps*) son proteínas de membrana integrales que utilizan la energía celular para expulsar activamente antibióticos o biocidas al exterior (Nishino, 2012). En este trabajo hemos podido comprobar la existencia en la subsp. *damsela* de este tipo de bombas, que están potencialmente implicadas en la resistencia a compuestos como antibióticos, telurito de potasio o ácidos biliares.

Hemos observado en la subsp. *damsela* la presencia de numerosos transportadores de membrana para alanina/sodio, fosfato, mononucleótido de nicotinamida, ribosa y aminoazúcares. Hemos observado además en la subsp. *damsela* la presencia de un mayor número de genes relacionados con la virulencia. Entre ellos, encontramos genes que codifican proteínas pertenecientes al grupo de las adhesinas como hemaglutininas o lectinas y homólogos de los genes *vep07* (que codifica una toxina tipo RTX), *stcE* (codifica una zinc metaloproteasa), o *dly*, el gen que codifica la damselisina, una potente toxina secretada por algunas cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* que presenta actividad esfingomielinasa y hemolítica frente a diferentes tipos de eritrocitos (Kreger *et al.*, 1987).

Gran parte de las toxinas secretadas por bacterias se exportan al exterior celular mediante sistemas de secreción de tipo I, II o VI (Records, 2011; Linhartova *et al.*, 2010). Hemos encontrado homólogos de componentes de estos tres sistemas en la subsp. *damsela* que podrían jugar un papel en la secreción de las diferentes toxinas codificadas en su genoma. Además hemos identificado homólogos de proteínas que presentan dominios GGDEF/EAL, reguladores de tipo AraC y un homólogo del gen *bvgS*, candidatos a jugar un papel en la regulación de toxinas y otros factores de virulencia.

Las diferencias fenotípicas entre las dos subespecies de *P. damsela* son bien conocidas. Uno de los objetivos planteados en la realización de este ensayo fue el tratar de esclarecer al menos en parte la base genética de tales diferencias. Así, hemos

encontrado una serie de genes potencialmente implicados de una forma directa en la codificación de las diferencias fenotípicas observadas. Los genes *flaK* y *fliD* están involucrados en la ruta de síntesis del flagelo. La presencia diferencial de estos genes en la subsp. *damselae* explicaría la diferente movilidad observada entre ambas subespecies. La pérdida o inactivación de alguno de estos genes pudo dar lugar al fenotipo inmóvil que presenta la subsp. *piscicida*.

Asimismo, hemos observado la presencia diferencial de genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno en la subsp. *damselae*. Estos genes se hallan involucrados en la reducción del ión nitrato (*nirB* y un gen que codifica una óxido nítrico reductasa). Otra de las diferencias fenotípicas observadas entre ambas subespecies es precisamente la capacidad de reducir nitratos que presenta la subsp. *damselae*.

*P. damselae* subsp. *damselae* es una bacteria patógena de animales homeotermos, mientras que *P. damselae* subsp. *piscicida* es patógena únicamente de animales poiquilotermos. Este diferente rango de hospedadores en parte viene determinado por la capacidad de crecimiento a 37 °C que presenta la subsp. *damselae*. Hemos observado la presencia de dos genes homólogos a chaperonas en la subsp. *damselae*. Su contribución al mantenimiento de la estabilidad proteica podría jugar un importante papel durante el crecimiento a 37 °C de la subsp. *damselae*. Otra característica destacable de esta subespecie que la diferencia de la subsp. *piscicida* es la capacidad de producir ácido a partir de maltosa. El hallazgo de dos transportadores pertenecientes a un sistema de tipo ABC implicados en transporte de maltosa al interior celular explicaría en parte esta característica que es exclusiva de la subsp. *damselae*.

Uno de los rasgos fenotípicos que diferencian a la subsp. *damselae* de la subsp. *piscicida* es la capacidad de producir hemólisis en diferentes tipos de sangre. En este trabajo hemos descrito la presencia del gen *dly*, una hemolisina caracterizada en los años 80 que muestra actividad fosfolipasa D frente a esfingomielina y que es característica de las cepas más virulentas de *P. damselae* subsp. *damselae* (Kreger, 1984; Kreger *et al.*, 1987). Esta hemolisina junto con otras que no se habían descrito

hasta el momento, son las responsables de las diferencias en el fenotipo hemolítico que muestran ambas subespecies.

*Photobacterium histaminum* fue inicialmente descrita como una nueva especie que se caracterizaba por la producción de histamina. Estudios posteriores reasignaron dicha bacteria a *P. damsela* subsp. *damsela* (Kimura *et al.*, 2000). Nuestro hallazgo, mediante el ensayo de hibridación sustractiva, de genes pertenecientes a la subsp. *damsela* implicados en la producción de histamina podrían constituir otro rasgo a añadir a la lista de diferencias entre ambas subespecies.

### **Actividad hemolítica y virulencia en *P. damsela* subsp. *damsela***

Como hemos mencionado anteriormente, una de las diferencias fenotípicas más claras entre las cepas pertenecientes a la subsp. *damsela* con respecto a las cepas de la subsp. *piscicida* es la capacidad de producir hemólisis en diferentes tipos de sangre, tanto de peces como de mamíferos. Se ha señalado que eritrocitos procedentes de diferentes especies de animales homeotermos son sensibles tanto a las células como a los productos extracelulares de *P. damsela* subsp. *damsela* (Kreger, 1984). Además estudios previos habían demostrado que los eritrocitos de rodaballo son también sensibles a los productos extracelulares de las células de *P. damsela* subsp. *damsela*, y los síntomas que esta bacteria provoca en peces están claramente relacionados con la producción de compuestos extracelulares que incluyen actividades fosfolipasa o hemolítica (Fouz *et al.*, 1993).

Esta diferencia fenotípica se confirma también a nivel genético puesto que en este trabajo hemos podido caracterizar el gen que codifica la damselisina (Dly) y un gen que codifica un homólogo de HlyA, otra hemolisina. A pesar de que la actividad biológica de la Dly se conoce desde hace tiempo (Kothary & Kreger, 1985), su localización en el contexto genómico de la subespecie era desconocida hasta la fecha. En este trabajo hemos descubierto que el gen *dly* se encuentra formando parte de un plásmido de 153 kb que hemos bautizado como pPHDD1. En línea con nuestros resultados, estudios previos mostraron que todos los aislados altamente hemolíticos contenían un plásmido de 150-170 kb (Fouz *et al.*, 1992). En cambio, las cepas débilmente hemolíticas carecían de dicho plásmido, con la excepción de la cepa ATCC

33539 que aún conteniéndolo, mostraba un fenotipo hemolítico moderado (Takahashi *et al.*, 2008). Al igual que muchos plásmidos de gran tamaño, pPHDD1 presenta una estructura en forma de mosaico modular. En este sentido, es destacable que los diferentes módulos de pPHDD1 muestren similitud con genes plasmídicos de diferentes taxones bacterianos. Mientras los genes *tra* y *tad* muestran homologías con plásmidos pertenecientes a bacterias del género *Vibrio*, los genes *par* y los pseudogenes de secreción de las colicinas muestran homólogos plasmídicos pertenecientes a especies de la familia *Enterobacteriaceae*.

El operón *tad* está involucrado en la patogenicidad de diferentes bacterias como es el caso de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Pasteurella multocida* y *Yersinia ruckeri* (Tomich *et al.*, 2007; Clock *et al.*, 2008). Curiosamente, ésta es la primera vez que se describe un operón de genes *tad* en un contexto plasmídico dentro de la familia *Vibrionaceae*, ya que hasta la fecha solo se han descrito genes *tad* en los plásmidos pSIM de *Sinorizobium meliloti* y pRL11 de *Rhizobium leguminosarum*. La presencia de un operón *tad* en un plásmido en la familia *Vibrionaceae* sugiere que la transferencia conjugativa es otro mecanismo por el cual los genes *tad* se pueden extender dentro del ambiente marino. En este sentido, los genes *tra* presentes en pPHDD1 permiten que este plásmido sea transferido mediante conjugación a otras bacterias. De hecho, hemos podido conjugar pPHDD1 desde una cepa de la subsp. *damselae* a otra cepa de la subsp. *piscicida*, aunque la tasa de transferencia obtenida fue muy baja, por causas que desconocemos. Varios plásmidos de pequeño y gran tamaño, así como elementos integrativos y conjugativos han sido descritos en cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* (do Vale *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008; Osorio *et al.*, 2008). Es posible por tanto que la baja frecuencia de transferencia de pPHDD1 se pueda explicar por incompatibilidades plasmídicas, mecanismos de exclusión de entrada, debido a la presencia de plásmidos en la bacteria receptora, o la necesidad de una inducción de la respuesta SOS o cualquier estrés medioambiental necesario para provocar la transferencia conjugativa (Beaber *et al.*, 2004).

El plásmido pPHDD1 parece que continúa manteniendo cierta plasticidad, ya que la inserción B exclusiva de la cepa RM-71, se escindió de la cepa de *P. damsela* subsp. *piscicida* receptora de pPHDD1, probablemente debido a un evento de

recombinación mediada por una recombinasa específica de sitio. Aunque mediante búsqueda de homologías entre proteínas no se observaron sistemas de adición en pPHDD1, la curación de este plásmido sólo se pudo conseguir a través de un evento raro que probablemente conlleve la aparición de mutaciones adicionales o bien la pérdida de ADN en alguna región del genoma. Las razones que expliquen la dificultad de curación, así como las mutaciones que faciliten la pérdida de pPHDD1 son por el momento desconocidas.

La existencia de dos categorías hemolíticas dentro de *P. damsela* subsp. *damsela* ha sido observada en diversos trabajos previos (Clarridge & Zighelboimdaum, 1985; Osorio *et al.*, 2000; Labella *et al.*, 2010) en los que se muestra una clara distinción entre cepas fuertemente hemolíticas y cepas débilmente hemolíticas en placas de agar sangre. Otros estudios habían revelado la presencia del gen *dly* únicamente en aquellas cepas con un fuerte fenotipo hemolítico (Cutter & Kreger, 1990). En concordancia con estas observaciones, en nuestro trabajo hemos observado una relación directa entre la presencia del gen *dly*, y por consiguiente también pPHDD1, y la producción de grandes halos hemolíticos en placas de agar sangre.

Hasta la fecha, la hemólisis causada por *P. damsela* subsp. *damsela* ha sido explicada exclusivamente en base a la toxina Dly, si bien estudios previos señalaron la posible existencia de otras hemolisinas adicionales (Kothary & Kreger, 1985). Nuestros resultados corroboran esta idea, ya que la caracterización del plásmido pPHDD1 mostró la existencia de una segunda hemolisina, HlyA. Nuestros experimentos con mutantes simples y dobles demuestran que Dly no es la única hemolisina responsable de causar el fuerte fenotipo hemolítico observado en las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* que contienen el plásmido pPHDD1. Concretamente hemos observado que ambas hemolisinas, Dly y HlyA, contribuyen a la actividad hemolítica. A partir de los resultados obtenidos con el mutante  $\Delta dly$ , podemos concluir que Dly muestra una contribución hemolítica diferencial dependiendo del tipo de eritrocito utilizado, siendo el principal contribuyente en la hemólisis de eritrocitos de rodaballo, ratón, rata y humano. Esta selectividad puede ser explicada en base a la composición de los lípidos de la membrana de los eritrocitos de cada especie (Ivanov, 2007). La composición de



los lípidos de membrana de los eritrocitos es prácticamente idéntica en todos los mamíferos, salvo en el caso de la esfingomielina, que de manera parcial es equimolarmente sustituida por fosfatidilcolina en varias especies. Tal variabilidad en el porcentaje de esfingomielina en la membrana de los eritrocitos, junto con el hecho de que Dly muestra actividad fosfolipasa D frente a esfingomielina (Kreger *et al.*, 1987), podría explicar que, dependiendo del tipo de sangre utilizada, se observen diferentes grados de hemólisis en los mutantes  $\Delta dly$  y  $\Delta hlyA$ . Además, no se puede descartar una relación entre el contenido de esfingomielina, hemólisis mediada por Dly y temperatura. Puesto que la esfingomielina juega un papel en la termoestabilidad de la membrana de los eritrocitos (Ivanov, 2007), la retirada de las cabezas polares de colina de la esfingomielina debido a la acción esfingomielinasa de Dly podría explicar la aparición de un halo turbio mayor en la cepa parental y en el mutante  $\Delta hlyA$  (las dos cepas productoras de damselisina) cuando la hemólisis se realiza a 37 °C.

Trabajos previos indicaron la existencia de una relación entre la virulencia de *P. damsela* subsp. *damsela* para ratón y la capacidad de producir Dly (Kreger, 1984; Kreger *et al.*, 1987). Nuestros resultados demuestran que pPHDD1 es necesario para conseguir el máximo grado de virulencia de *P. damsela* subsp. *damsela* en ratón y rodaballo. La contribución de las dos hemolisinas a la virulencia parece ser mayor que una mera suma individual de sus actividades, lo que sugiere la existencia de interacciones de tipo sinérgico entre ambas hemolisinas para alcanzar los máximos valores de virulencia para ratón y rodaballo. En base a nuestro trabajo, hemos observado que pPHDD1 se encuentra ampliamente distribuido entre las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* aisladas de peces marinos infectados. De esta manera, este patógeno que habita ambientes marinos y que infecta especies poiquilotermas, contiene factores de virulencia que podrían ser considerados como un posible factor de riesgo para la salud pública.

El hallazgo de que las cepas que carecen de pPHDD1, así como la cepa doble mutante  $\Delta dly-hlyA$ , todavía producen una débil hemólisis, sugiere la existencia de otras hemolisinas codificadas en el cromosoma de *P. damsela* subsp. *damsela*. De acuerdo con esta observación, en estudios previos se señaló la existencia de un componente mayor y dos menores en los sobrenadantes de *P. damsela* subsp. *damsela* que

mostraron actividad hemolítica en ensayos de isoelectroenfoque en capa fina (Kothary & Kreger, 1985). Esta evidencia es consistente con nuestra observación de que la cepa exconjugante de *P. damsela* subsp. *piscicida* muestra un fenotipo hemolítico menor que las cepas de la subsp. *damsela* que contienen pPHDD1, lo que suscita la idea de la existencia de hemolisinas adicionales que no se encuentran codificadas en pPHDD1. La búsqueda *in silico* de genes de hemolisinas en el genoma de la cepa tipo ATCC 33539 de *P. damsela* subsp. *damsela* nos llevó al descubrimiento de un gen homólogo a *hlyA* codificado en el cromosoma (por lo que de aquí en adelante serán nombrados como *hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>* respectivamente). Ambas proteínas, al igual que VCC, la citolisina de *V. cholerae*, pertenecen a la familia de las toxinas formadoras de poro (PFTs).

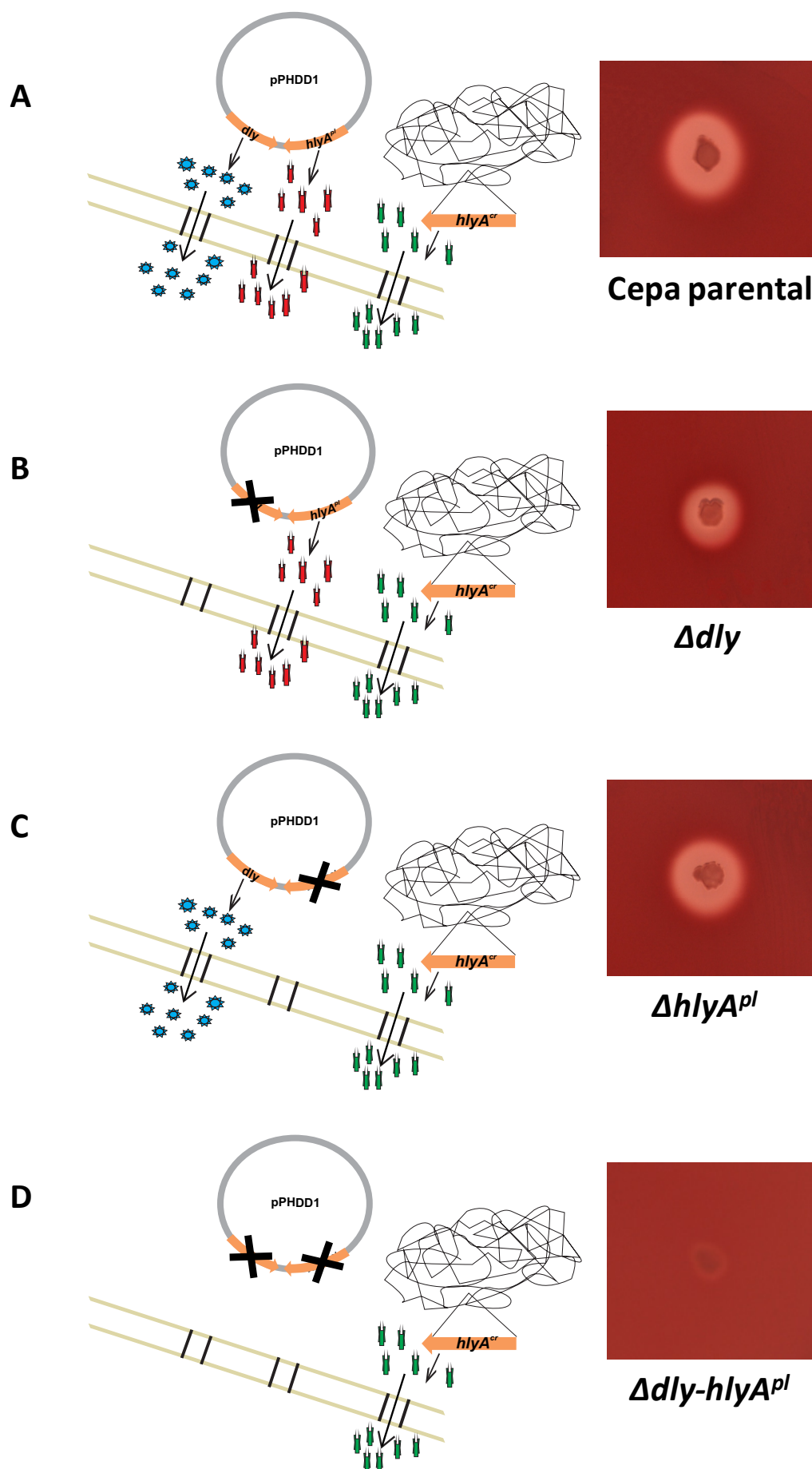
Estas toxinas actúan como factores de virulencia que contribuyen sustancialmente a la patogenicidad bacteriana causando daño en órganos y tejidos o incluso la muerte cuando son inyectadas en animales de experimentación. Aunque dentro de esta familia algunas toxinas compartan secuencias comunes, otras tienen muy poca homología en su secuencia, a pesar de mostrar similitudes en su modo de acción (Iacovache *et al.*, 2008), que consiste en: los monómeros solubles de la toxina son liberados al medio y se unen a la membrana formando oligómeros anfipáticos asociados de manera no covalente que dan lugar a una estructura con forma de anillo conocida como preporo. Posteriormente, un cambio conformacional da lugar a la inserción del canal transmembrana y la consecuente formación del poro (Iacovache *et al.*, 2008). Las toxinas formadoras de poro se agrupan bajo dos clases según el tipo de estructura que atraviese la membrana plasmática: canales  $\alpha$ -hélice ( $\alpha$ -PFTs) o canales  $\beta$ -barril ( $\beta$ -PFTs) (Tilley & Saibil, 2006). Este último grupo es el más abundante y a él pertenece VCC. VCC permanece en disolución como monómero y sólo oligomeriza en contacto con la membrana celular. La oligomerización se produce por el contacto entre protómeros (Lohner *et al.*, 2009), y al igual que la toxina estafilocócica, los oligómeros se componen de heptámeros que forman un poro de un tamaño similar al formado por la toxina estafilocócica (Valeva *et al.*, 2005). El análisis comparativo de los dominios proteicos de VCC y las dos HlyAs de *P. damsela* subsp. *damsela* mostró una gran similitud en los aminoácidos que ocupan posiciones conservadas dentro de estos dominios, especialmente en el dominio citolítico. En cambio, la identidad mostrada por

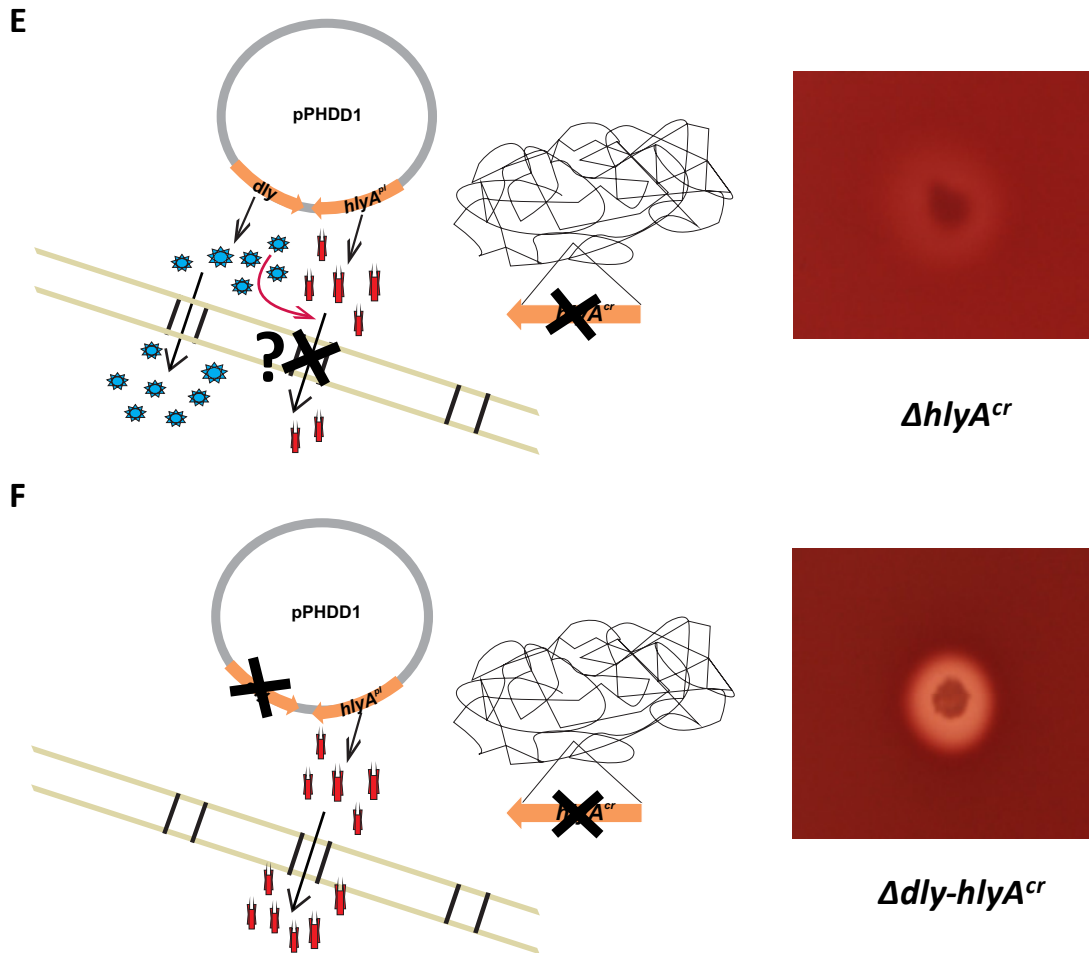
los dominios N-terminal es significativamente más baja. Este aspecto podría ser debido a que el dominio N-terminal no juega ningún papel en la actividad hemolítica, por lo que podría admitir cierta relajación en la composición aminoacídica sin afectar a la actividad hemolítica. A diferencia de VCC y otras hemolisinas pertenecientes a especies del género *Vibrio* que presentan dos dominios lectina, HlyA presenta un único dominio lectina, lo que explica la diferencia de tamaño que presenta con respecto a VCC. Debido a su capacidad de unión a carbohidratos, se cree que estos dominios son los implicados en el reconocimiento de moléculas glucosiladas que actuarían como receptores para la toxina, además de jugar un papel importante en la generación de un canal funcional (Mazumdar *et al.*, 2011). HlyA, que carece de un segundo dominio lectina, es funcional, lo que sugiere que este segundo dominio lectina no es imprescindible para causar hemólisis y quizás sea ésta la razón por la que se haya perdido en HlyA.

La mutación del gen *hlyA<sup>cr</sup>* en las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* doble mutante *dly-hlyA<sup>pl</sup>* y LD-07 que carece del plásmido pPHDD1, provocó una completa supresión de la actividad hemolítica. Este hecho nos lleva a la conclusión de que en las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* que contienen pPHDD1 la hemólisis depende de Dly, HlyA<sup>pl</sup> y HlyA<sup>cr</sup> y exclusivamente de HlyA<sup>cr</sup> en las cepas que carecen de pPHDD1. Cuando mutamos el gen *hlyA<sup>cr</sup>* sobre la cepa parental apenas se observa reducción de la actividad hemolítica en las sangres de ratón y rodaballo, algo esperable ya que en estas sangres Dly juega un papel principal. En cambio en sangre de oveja se observó una drástica reducción de la actividad hemolítica. Esta reducción es provocada por una represión en la actividad hemolítica de HlyA<sup>pl</sup>. Dicha represión desaparece al mutar el gen *dly*. Este resultado demuestra que al mutar el gen *hlyA<sup>cr</sup>*, Dly provoca una represión de la actividad hemolítica de HlyA<sup>pl</sup>. Nuevamente a 37 °C se pudo observar sólo en las cepas que producían Dly, un halo turbio más grande comparado con el producido a 25 °C. En trabajos previos se demostró que Dly es muy activa frente a eritrocitos de ratón y débilmente activa frente a eritrocitos de oveja (Kothary & Kreger, 1985). Nuestros resultados muestran que las hemolisinas Dly, HlyA<sup>pl</sup> y HlyA<sup>cr</sup> presentan una especificidad diferencial según el tipo de sangre. Dly es muy activa frente a

eritrocitos de rodaballo, ratón, rata y en menor medida frente a los humanos, y HlyA parece ser muy activa frente a eritrocitos de oveja.

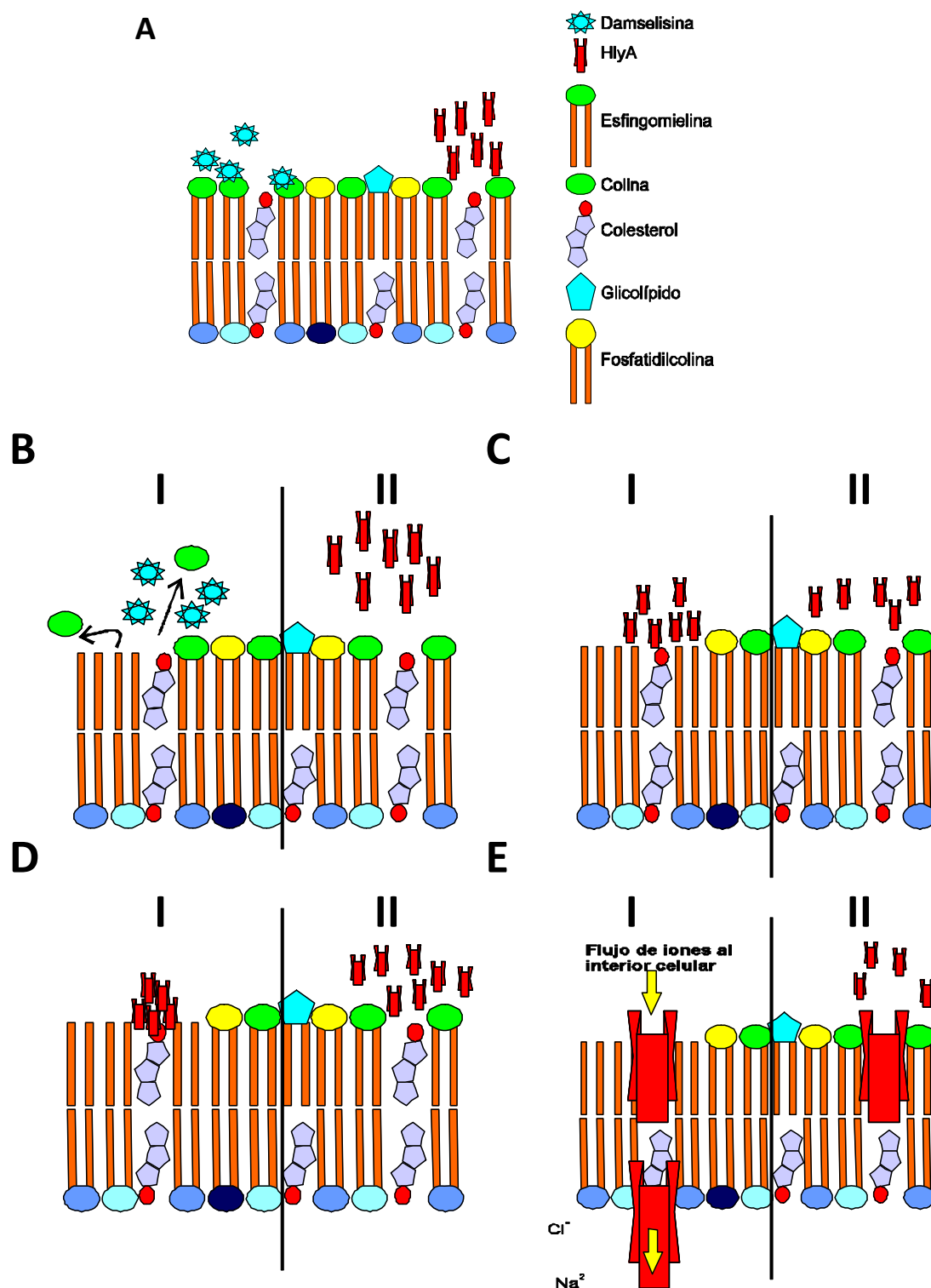
Los resultados obtenidos en los ensayos de hemólisis en líquido confirman que la actividad hemolítica de *P. damsela* subsp. *damsela* reside en las tres hemolisinas Dly, HlyA<sup>pl</sup> y HlyA<sup>cr</sup>, ya que la cepa triple mutante no presenta valores de actividad hemolítica. El mutante  $\Delta hlyA^{cr}$  muestra una pequeña actividad hemolítica, lo que demuestra que la represión de la actividad de HlyA<sup>pl</sup> no es total y que pequeñas cantidades de HlyA<sup>pl</sup> son secretadas. De los resultados obtenidos con las cepas mutantes  $\Delta dly-hlyA^{pl}$  y  $\Delta dly-hlyA^{cr}$  podemos deducir que HlyA<sup>pl</sup> y HlyA<sup>cr</sup> presentan diferentes actividades hemolíticas, llegándose a obtener el doble de unidades hemolíticas en el caso de HlyA<sup>pl</sup>. La expresión de los genes de dichas hemolisinas dentro de *E. coli* confirma la mayor actividad hemolítica de HlyA<sup>pl</sup>. Los ensayos de mezcla de sobrenadantes muestran claramente una ausencia de fenómenos de represión entre Dly y HlyA<sup>pl</sup> a nivel extracelular y sobre todo se observa la existencia de un efecto sinérgico entre Dly y las dos hemolisinas, HlyA<sup>pl</sup> y HlyA<sup>cr</sup>, ya que la suma de las actividades individuales no alcanza los mismos valores que los obtenidos cuando Dly se halla conjuntamente con una o las dos HlyAs. Los resultados obtenidos de la expresión de los genes de las tres hemolisinas en *E. coli* demuestran efectos sinérgicos entre Dly y las dos HlyAs, siendo más patente en el caso de HlyA<sup>pl</sup> (probablemente debido a la mayor actividad hemolítica que presenta). Sólo cuando se expresan las tres hemolisinas conjuntamente se observa un halo hemolítico similar al producido por la cepa parental, lo que demuestra que Dly, HlyA<sup>pl</sup> y HlyA<sup>cr</sup> son imprescindibles para alcanzar los valores máximos de hemólisis. A continuación se muestra un modelo donde se representa la secreción de las hemolisinas Dly, HlyA<sup>pl</sup> y HlyA<sup>cr</sup> en las diferentes cepas mutantes para dichos genes (Figura V.1):





**Figura V.1:** Modelo de secreción de las hemolisinas Dly, HlyA<sup>pl</sup> y HlyA<sup>cr</sup> en la cepa parental y en cepas deficientes para la producción de alguna de las tres hemolisinas: (A) La cepa parental (AR57) produce las tres hemolisinas dando lugar a la mayor actividad hemolítica observada en las placas de agar sangre. (B) La delección del gen *dly* produce una reducción significativa del halo hemolítico. Aunque Dly es débilmente activa frente a eritrocitos de oveja, su acción potencia la actividad hemolítica de las HlyAs dando lugar a los fenómenos de sinergia hemolítica. (C) La delección del gen *hlyA<sup>pl</sup>* produce una suave disminución de la actividad hemolítica, ya que la acción sinérgica entre Dly y HlyA<sup>cr</sup> es suficiente para cubrir la falta de HlyA<sup>pl</sup>. (D) El halo hemolítico producido exclusivamente por HlyA<sup>cr</sup> es significativamente pequeño. Esta drástica reducción se produce en menor medida por la falta de HlyA<sup>pl</sup> y principalmente por la falta de Dly, responsable de causar los fenómenos de sinergia hemolítica con las HlyAs. (E) La delección del gen *hlyA<sup>cr</sup>* provoca una represión casi total de la secreción de HlyA<sup>pl</sup> (su promotor se expresa de manera regular), y debido a la baja actividad de Dly frente a eritrocitos de oveja, no se produce un halo de β-hemólisis completo. Esta represión se halla mediada por Dly ya que al deleccionar sobre esta cepa el gen *dly*, se produce un restablecimiento de la actividad hemolítica (F). Dicho halo hemolítico es producido en esta cepa (*Δdly-hlyA<sup>cr</sup>*) exclusivamente por la actividad de HlyA<sup>pl</sup>.

En trabajos previos se ha demostrado que Dly actúa de manera sinérgica con la delta toxina estafilocócica en eritrocitos de oveja, ya que el acceso a la bicapa lipídica de la delta toxina se ve favorecida por la retirada de las cabezas polares de colina debido a la actividad esfingomielinasa de Dly (Kreger *et al.*, 1987). Se ha demostrado que el colesterol es requerido por diferentes toxinas formadoras de poro para provocar la lisis en la membrana plasmática. La oligomerización de la citolisina de *V. vulnificus* requiere colesterol (Yu *et al.*, 2007), y dicha oligomerización normalmente es promovida por dominios de membrana ricos en colesterol o por balsas lipídicas (Bischofberger *et al.*, 2009). La toxina estafilocócica  $\alpha$ -toxina presenta su lugar de unión en microdominios de membrana ricos en colesterol y esfingomielina (Valeva *et al.*, 2006). La oligomerización y formación del poro de VCC requiere la presencia de más de una molécula de colesterol y éste ha de encontrarse en las dos capas de la membrana lipídica (Krasilnikov *et al.*, 2007), si bien hay que decir que esta interacción es realmente más compleja y la oligomerización está mediada por complejos colesterol-esfingolípidos más que por moléculas lipídicas individuales (Zitzer *et al.*, 1999). Se ha demostrado que la esfingomielina es menos efectiva que la ceramida a la hora de sensibilizar las membranas para la acción de VCC. Este efecto inhibitorio, conocido como “umbrella model”, es provocado por las cabezas polares de colina que actúan a modo de escudo protegiendo el colesterol de la acción de VCC (Zitzer *et al.*, 2001). Este modelo podría ser aplicado al efecto sinérgico observado entre Dly y las dos HlyAs de *P. damsela* subsp. *damsela* donde la acción fosfolipasa de Dly eliminando las cabezas polares de colina de la esfingomielina permitiría a las HlyAs aumentar su actividad hemolítica. La eliminación de las cabezas polares de colina dejaría áreas abiertas en la capa externa de la membrana de los eritrocitos que permitiría una mayor susceptibilidad de la capa interna de la membrana a la acción de las HlyAs. En la Figura V.2 se ilustra el modelo de actuación de las hemolisinas sobre las membranas eucariotas basándonos en los resultados obtenidos en este trabajo y el “umbrella model” (Zitzer *et al.*, 1999; Zitzer *et al.*, 2001).



**Figura V.2:** Modelo de actuación de las hemolisinas Dly y HlyA sobre las membranas de las células eucariotas. A: Dly reconoce las moléculas de esfingomielina y HlyA reconoce las zonas de la membrana donde se halla embebido el colesterol. Dly debido a su actividad esfingomielinasa libera las cabezas polares de colina (B.I), en cambio en ausencia de Dly no se produce dicha liberación (B.II). La acción de la Dly provoca que HlyA reconozca más rápidamente las moléculas de colesterol (C.I), en cambio en las zonas donde se mantienen las cabezas de colina, se crea un impedimento estérico que actúa a modo de “paraguas” protegiendo las moléculas de colesterol de la acción de la HlyA (C.II). Este impedimento



Un proceso hemolítico cooperativo es un proceso donde la acción de un “primer agente” modifica la membrana celular de manera no lítica o sublítica provocando la aparición de nuevas moléculas diana o una mayor accesibilidad a la membrana por parte de un “segundo agente” que provocaría la lisis celular. Ampliamente descritas como primeros agentes, las esfingomielinasas son las responsables de las áreas hemolíticas incompletas en placas de agar sangre de oveja (Ripio *et al.*, 1995; Hebert & Hancock, 1985). Este es el caso de las esfingomielinasas de *S. aureus* o *Listeria ivanovii* que al hidrolizar las cabezas de colina de la esfingomielina permiten el acceso al colesterol por parte de la colesterol oxidasa de *Rhodococcus equi*. Dicha interacción conlleva la destrucción de la membrana plasmática (Schaufuss *et al.*, 2005). En nuestro trabajo, hemos observado reacciones CAMP en cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* que no producen Dly, pero que sí producen HlyA<sup>cr</sup> y HlyA<sup>pl</sup> o únicamente HlyA<sup>cr</sup> (doble mutante  $\Delta dly-hlyA^{pl}$  y cepas negativas para pPHDD1). Cuando estas cepas son sembradas en placas de agar sangre de oveja en la proximidad de una cepa productora de Dly, dichas cepas adquieren un halo hemolítico con forma de media luna en la zona parcialmente lisada por la acción esfingomielinasa de Dly. Estas reacciones CAMP se producen por la interacción de Dly, actuando como primer agente, con HlyA<sup>cr</sup> o HlyA<sup>pl</sup> que actuarían como segundos agentes. En ausencia de Dly no se observaron reacciones CAMP al igual que no se observaron reacciones CAMP en ausencia de las dos HlyAs. La similitud en el modo de acción entre HlyA y VCC observada en los análisis *in silico* queda también reflejada en las reacciones CAMP, ya que Dly es capaz de generar fenómenos de sinergia con *V. cholerae*. En trabajos previos se demostró la existencia de reacciones CAMP en cepas hemolíticas de *V. cholerae* cuando se sembraban en la proximidad de una cepa de *S. aureus* productora de  $\beta$ -hemolisina estafilocócica (Lesmana *et al.*, 1994). Otros autores han demostrado que la mutación de *hlyA* de *V. cholerae* provoca una supresión de la actividad hemolítica (Records, 2011). Contrastando estos resultados con los obtenidos en este trabajo proponemos que el factor CAMP producido por *V. cholerae* es VCC. Las reacciones CAMP observadas entre *P. damsela* y *V. cholerae*, *S. agalactiae*, *Aeromonas shubertii* y *R. equi* sitúan a Dly como una herramienta útil a la hora de diferenciar especies bacterianas mediante ensayos de tipo CAMP.

Excepto en el caso de la bacteria Gram positiva *Bacillus cereus*, la cual es capaz de producir fenómenos de sinergia hemolítica por sí misma (Beecher & Wong, 2000), las reacciones CAMP se han basado en la confluencia de los productos extracelulares de dos especies bacterianas diferentes. Según nuestro conocimiento, nuestros resultados suponen la primera descripción de una reacción CAMP producida entre cepas de una misma especie de bacterias Gram negativas.

Nuestros resultados muestran que el mecanismo que regula la producción de estas hemolisinas es muy complejo. La delección del gen *hlyA<sup>cr</sup>* provoca una represión de la actividad de HlyA<sup>pl</sup>. Hemos comprobado que dicha represión no ocurre ni a nivel de interacción entre hemolisinas ni a nivel extracelular. Sabemos que en esta represión se halla involucrada Dly, ya que la represión desaparece en el mutante  $\Delta dly$ -*hlyA<sup>cr</sup>* que recupera su actividad hemolítica. En otro ensayo pudimos apreciar que las cepas  $\Delta dly$ -*hlyA<sup>cr</sup>* y  $\Delta hlyA^{cr}$ , cuando se crecieron sobre una placa con un halo previamente producido por la damselisina, presentaban una total represión de su actividad hemolítica únicamente en la zona parcialmente lisada. Este resultado refleja que la represión, que parece ser dosis dependiente, se halla mediada por la presencia de Dly, tanto Dly producida por la propia célula como Dly procedente de otras cepas.

Ensayos con fusiones transcripcionales muestran que la represión no ocurre a nivel transcripcional, ya que el mutante  $\Delta hlyA^{cr}$  muestra niveles de expresión normales en los tres promotores testados. Este resultado, junto con los observados anteriormente, sugiere una represión a nivel traduccional o a nivel de la maduración proteica. Hemos observado que la expresión de las tres hemolisinas es dependiente de la fase de crecimiento, observándose los valores más altos de expresión  $\beta$ -galactosidasa en la fase exponencial. Sin embargo en las tres primeras horas de crecimiento los niveles de expresión fueron significativamente bajos. Este hecho sugiere que en la regulación de las hemolisinas aparecen otros factores reguladores que aumentan o disminuyen la expresión génica. En resumen, los datos obtenidos de los ensayos de expresión génica indican que los promotores de los genes *dly*, *hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>* muestran unos valores similares de actividad  $\beta$ -galactosidasa en todas las combinaciones de cepas mutantes para dichos genes, lo que sugiere que la delección de uno o varios de estos genes no afecta a la expresión de otros genes hemolíticos.

## Las condiciones medioambientales regulan la transcripción de las hemolisinas

En este trabajo hemos comprobado que en condiciones de déficit de hierro la expresión de los genes de las tres hemolisinas aumenta considerablemente, sobre todo la de *hlyA<sup>pl</sup>*. El aumento en la expresión de las hemolisinas permite una mayor disponibilidad de hierro, proporcionando una fuente extra de hemoglobina. Está demostrado que existe una relación muy próxima entre la disponibilidad de hemoglobina y la susceptibilidad a una infección bacteriana (Ascenzi *et al.*, 2005). Otro factor importante involucrado en la expresión de las hemolisinas es la concentración de NaCl en el medio. En trabajos previos se observó que los medios de cultivo que contenían una concentración mayor o igual del 0,8% de ión Na<sup>+</sup> provocaban una considerable reducción de los niveles de toxina producidos en *P. damsela* subsp. *damsela* (Kreger, 1984). Nuestros resultados demuestran que el aumento de la concentración de NaCl en el medio produce una reducción de los niveles de expresión génica en los tres genes *dly*, *hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>*. Además de los genes testados en este trabajo, otros autores han demostrado la existencia de otros genes regulados por la concentración de NaCl (Wu *et al.*, 2006). Esta observación, así como los resultados obtenidos en este trabajo, nos lleva a pensar que los mecanismos de regulación basados en la concentración de NaCl sigan un mecanismo general que se encuentre probablemente codificado en el cromosoma de *P. damsela* subsp. *damsela*. Las condiciones ambientales utilizadas en este trabajo (baja concentración de NaCl y deficiencia de hierro) dan lugar a los niveles de expresión más altos en las tres hemolisinas. Estas condiciones podrían aproximarse más a las condiciones que la bacteria experimenta durante la infección. Hemos visto que *Dly*, *HlyA<sup>pl</sup>* y *HlyA<sup>cr</sup>* están involucradas en la virulencia de *P. damsela* subsp. *damsela*, por lo que es de esperar una máxima expresión de estos factores de virulencia bajo condiciones ambientales como las aquí utilizadas, que simulan *in vitro* parte de las características del hospedador durante la infección.

En el capítulo anterior hemos demostrado que pPHDD1 es necesario para el máximo grado de virulencia de *P. damsela* subsp. *damsela* en ratón y rodaballo. Pero la virulencia de esta bacteria no solo reside en pPHDD1, sino que también es

dependiente de la HlyA codificada en el cromosoma (HlyA<sup>cr</sup>). Nuestros resultados indican que la cepa AR129 ( $\Delta hlyA^{cr}$ ) muestra unos valores de virulencia similares para ambas especies. Dicha virulencia desciende ligeramente en la cepa AR158 ( $\Delta hlyA^{pl}-hlyA^{cr}$ ). Este pequeño descenso puede ser debido a que la represión sobre HlyA<sup>pl</sup> en la cepa AR129 no es completa, por lo que pequeñas cantidades de HlyA<sup>pl</sup> podrían ser secretadas contribuyendo así a un leve incremento de la virulencia. La cepa AR119 ( $\Delta dly-hlyA^{cr}$ ) mostró una virulencia para ratón similar a la observada en el mutante  $\Delta hlyA^{cr}$  (AR129). Este resultado demuestra que la delección del gen *dly* provoca una desrepresión de HlyA<sup>pl</sup>. Esta situación da lugar a un efecto de compensación donde la pérdida de la virulencia causada por Dly es contrarrestada por la ganancia de la virulencia producida por la acción de HlyA<sup>pl</sup>. En rodaballo esta situación no se observa ya que las HlyAs por sí solas no parecen ser suficientes para el desarrollo de la infección (los dobles mutantes  $\Delta dly-hlyA^{cr}$  y  $\Delta dly-hlyA^{pl}$  no produjeron mortalidad alguna). Los datos obtenidos en este trabajo muestran que la virulencia de *P. damsela* subsp. *damsela* para rodaballo viene determinada principalmente por la acción de la Dly, que además se ve potenciada por la presencia de las HlyAs debido a fenómenos de sinergia hemolítica entre dichas hemolisinas.

Nuestros resultados también sugieren que la virulencia de *P. damsela* subsp. *damsela* para ratón viene determinada principalmente por la actividad de Dly, HlyA<sup>pl</sup> y en menor medida HlyA<sup>cr</sup>. Hemos observado que a diferencia de lo que ocurre en rodaballo, HlyA<sup>cr</sup>, y sobre todo HlyA<sup>pl</sup>, se muestran especialmente dañinas para ratón, contribuyendo significativamente a la virulencia. Nuevamente los valores máximos de virulencia derivan de fenómenos de sinergia entre las tres hemolisinas.

La realización de este trabajo nos ha permitido identificar genes específicos de cada subespecie. Algunos de estos genes claramente se encuentran detrás de las diferencias fenotípicas, en cambio serán necesarios trabajos más exhaustivos para poder desentrañar el papel que puedan jugar otros genes descritos en este trabajo en la explicación de tales diferencias. Aunque hemos descrito genes claramente regulados por hierro, no hemos podido determinar la base genética de la captación de hierro mediada por sideróforos en *P. damsela*, quedando este aspecto sujeto al diseño de nuevas estrategias que nos permitan en un futuro dilucidar estos sistemas. Hemos

podido describir un nuevo plásmido de 150 kb denominado pPHDD1 cuya implicación en la actividad hemolítica y virulencia de *P. damsela* subsp. *damsela* ha sido demostrada. Además de las hemolisinas codificadas en pPHDD1 hemos encontrado otra hemolisina codificada en el cromosoma, que junto con las mencionadas anteriormente conforman la base genética de la actividad  $\beta$ -hemolítica en *P. damsela* subsp. *damsela*.



## VI. Conclusiones





Los datos obtenidos en el presente estudio aportan nuevos conocimientos que permiten comprender a nivel genético algunas de las diferencias fenotípicas observadas entre las dos subespecies de *Photobacterium damsela*, con especial atención a las bases genéticas de la producción de hemolisinas.

Las conclusiones específicas extraídas de lo expuesto en este trabajo son:

- 1) El gen de la O-metiltransferasa identificado en *P. damsela* supone la primera descripción de un gen de esta familia cuya transcripción está regulada negativamente por hierro mediante la proteína Fur. El gen de la O-metiltransferasa no es esencial para el crecimiento de *P. damsela* subsp. *damsela* en condiciones de limitación de hierro.
- 2) Los ensayos de hibridación sustractiva revelan una profunda diversidad genética en *P. damsela*. Parte de las diferencias fenotípicas entre ambas subespecies están determinadas por la presencia de genes exclusivos de la subsp. *damsela*. La presencia de múltiples copias de transposasas en el genoma de la subsp. *piscicida* podría haber producido la inactivación y pérdida de genes relacionados con algunos de los fenotipos diferenciales observados.
- 3) Las hemolisinas Dly (damselisina) y HlyA<sup>pl</sup>, dos de las principales responsables de la hemólisis en *P. damsela* subsp. *damsela*, están codificadas en pPHDD1, un plásmido de 153 kilobases. pPHDD1 puede ser movilizado a cepas de la subespecie *piscicida* y conferirles actividad hemolítica.
- 4) Las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* contienen una copia del gen *hlyA* en el cromosoma (*hlyA<sup>cr</sup>*). Por tanto, la actividad hemolítica de *P. damsela* subsp. *damsela* reside en los genes *dly*, *hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>* en las cepas que contienen pPHDD1, y únicamente en *hlyA<sup>cr</sup>* en las cepas que carecen de pPHDD1.

- 5) Dly interacciona de manera sinérgica con HlyA así como con hemolisinas de otras especies (*Vibrio cholerae*, *Aeromonas shubertii*, *Streptococcus agalactiae* y *Rhodococcus equi*).
- 6) Dly media un efecto represor de la actividad de HlyA<sup>pl</sup> en las cepas que tienen deletado el gen *hlyA<sup>cr</sup>*. La delección de *dly* en una cepa con *hlyA<sup>cr</sup>* intacto restablece la actividad hemolítica de HlyA<sup>pl</sup>. Tal represión no ocurre a nivel transcripcional, sino que debe ocurrir a nivel de la maduración proteica o secreción a través de la membrana celular.
- 7) Los promotores de los genes *dly*, *hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>* muestran una regulación dependiente de condiciones ambientales, como el nivel de hierro extracelular y la concentración de NaCl. Estos factores experimentan un drástico cambio dentro del organismo hospedador (descenso de la disponibilidad de hierro y descenso de la concentración de NaCl), por lo que dicha regulación podría garantizar una expresión máxima de las hemolisinas al establecer la infección.
- 8) La damselsina (Dly) resultó ser tóxica por sí sola tanto para ratón como para rodaballo. Sin embargo tanto HlyA<sup>pl</sup> como HlyA<sup>cr</sup>, individualmente mostraron cierta toxicidad para ratón, causando mortalidad en rodaballo únicamente en combinación con la Dly.
- 9) La delección de cualquiera de los tres genes, *dly*, *hlyA<sup>pl</sup>* y *hlyA<sup>cr</sup>*, provoca un descenso en la virulencia de *P. damsela* subsp. *damsela* para ratón y rodaballo. La alta virulencia que presentan las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* que contienen el plásmido pPHDD1 deriva de la acción sinérgica de las tres hemolisinas.

## VII. Bibliografía



**Acosta, F., Ellis, A. E., Vivas, J., Padilla, D., Acosta, B., Deniz, S., Bravo, J. & Real, F. (2006).** Complement consumption by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in seabream, red porgy and seabass normal and immune serum. Effect of the capsule on the bactericidal effect. *Fish Shellfish Immunol.* **20**, 709-717.

**Acosta, F., Vivas, J., Padilla, D., Vega, J., Bravo, J., Grasso, V. & Real, F. (2009).** Invasion and survival of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in non-phagocytic cells of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *J. Fish Dis.* **32**, 535-541.

**Adamczyk, M., Dolowy, P., Jonczyk, M., Thomas, C. M. & Jagura-Burdzy, G. (2006).** The *kfrA* gene is the first in a tricistronic operon required for survival of IncP-1 plasmid R751. *Microbiology* **152**, 1621-1637.

**Agren, J. A. & Wright, S. I. (2011).** Co-evolution between transposable elements and their hosts: a major factor in genome size evolution? *Chromosome* **19**, 777-786.

**Aigbivhalu, L. & Maraqa, N. (2009).** *Photobacterium damsela* wound infection in a 14-year-old surfer. *South Med. J.* **102**, 425-426.

**Álvarez, J. R., Lamba, S., Dyer, K. Y. & Apuzzio, J. J. (2006).** An unusual case of urinary tract infection in a pregnant woman with *Photobacterium damsela*. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **2006**, Article ID 80682.

**Allali, N., Afif, H., Couturier, M. & Van Melderren, L. (2002).** The highly conserved TldD and TldE proteins of *Escherichia coli* are involved in microcin B17 processing and in CcdA degradation. *J. Bacteriol.* **184**, 3224-3231.

**Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., Hananya-Meltabashi, M., Sacher, A. & Engelberg-Kulka, H. (2009).** *Escherichia coli* MazF leads to the simultaneous selective synthesis of both "death proteins" and "survival proteins". *PLoS Genet.* **5**, e1000390.

**Aoki, T. (1988).** Drug-resistant plasmids from fish pathogens. *Microbiol. Sci.* **5**, 219-223.

**Arijo, S., Borrego, J. J., Zorilla, I., Balebona, M. C. & Moriñigo, M. A. (1998).** Role of the capsule of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in protection against phagocytosis and killing by gilt-head seabream (*Sparus aurata*, L) macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* **8**, 63-72.

**Arold, S. T., Leonard, P. G., Parkinson, G. N. & Ladbury, J. E. (2010).** H-NS forms a superhelical protein scaffold for DNA condensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 15728-15732.

**Asato, J. & Kanaya, F. (2004).** Fatal infection of the hand due to *Photobacterium damsela*: A case report. *Clin. Infect. Dis.* **38**, 100-101.

**Ascenzi, P., Bocedi, A., Visca, P., Altruda, F., Tolosano, E., Beringhelli, T. & Fasano, M. (2005).** Hemoglobin and heme scavenging. *IUBMB Life* **57**, 749-759.

- Austin, B. (2010).** Vibrios as causal agents of zoonoses. *Vet. Microbiol.* **140**, 310-317.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A. & other authors (2008).** The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* **9**, 75.
- Bagg, A. & Neilands, J. B. (1987).** Molecular Mechanism of Regulation of Siderophore-Mediated Iron Assimilation. *Microbiol. Rev.* **51**, 509-518.
- Bakopoulos, V., Adams, A. & Richards, R. H. (1997).** The effect of iron limitation growth conditions on the cell and extracellular components of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *J. Fish Dis.* **20**, 297-305.
- Barber, G. R. & Swygert, J. S. (2000).** Necrotizing fasciitis due to *Photobacterium damsela* in a man lashed by a stingray. *N. Engl. J. Med.* **342**, 824-824.
- Barnes, A. C., Balebona, M. C., Horne, M. T. & Ellis, A. E. (1999).** Superoxide dismutase and catalase in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and their roles in resistance to reactive oxygen species. *Microbiology* **145**, 483-494.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R. & other authors (2004).** The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **32**, 138-141.
- Beaber, J. W., Hochhut, B. & Waldor, M. K. (2004).** SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* **427**, 72-74.
- Beecher, D. J. & Wong, A. C. (2000).** Cooperative, synergistic and antagonistic haemolytic interactions between haemolysin BL, phosphatidylcholine phospholipase C and sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. *Microbiology* **146**, 3033-3039.
- Bernheimer, A. W., Linder, R. & Avigad, L. S. (1979).** Nature and mechanism of action of the CAMP protein of group B streptococci. *Infect. Immun.* **23**, 838-844.
- Bischofberger, M., Gonzalez, M. R. & van der Goot, F. G. (2009).** Membrane injury by pore-forming proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 589-595.
- Boardman, B. K. & Satchell, K. J. (2004).** *Vibrio cholerae* strains with mutations in an atypical type I secretion system accumulate RTX toxin intracellularly. *J. Bacteriol.* **186**, 8137-8143.
- Bonet, R., Magariños, B., Romalde, J. L., Simon-Pujol, M. D., Toranzo, A. E. & Congregado, F. (1994).** Capsular polysaccharide expressed by *Pasteurella piscicida* grown in vitro. *FEMS Microbiol. Lett.* **124**, 285-289.
- Braun, V., Gunter, K. & Hantke, K. (1991).** Transport of iron across the outer-membrane. *Biology of Metals* **4**, 14-22.

- Buck, J. D., Overstrom, N. A., Patton, G. W., Anderson, H. F. & Gorzelany, J. F. (1991).** Bacteria associated with stranded cetaceans from the northeast USA and southwest Florida gulf coasts. *Dis. Aquat. Org.* **10**, 147-152.
- Cadieux, N., Bradbeer, C., Reeger-Schneider, E., Koster, W., Mohanty, A. K., Wiener, M. C. & Kadner, R. J. (2002).** Identification of the periplasmic cobalamin-binding protein BtuF of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**, 706-717.
- Cartron, M. L., Maddocks, S., Gillingham, P., Craven, C. J. & Andrews, S. C. (2006).** Feo transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals* **19**, 143-157.
- Carver, T. J., Rutherford, K. M., Berriman, M., Rajandream, M. A., Barrell, B. G. & Parkhill, J. (2005).** ACT: the Artemis comparison tool. *Bioinformatics* **21**, 3422-3423.
- Casas, V. & Maloy, S. (2011).** Role of bacteriophage-encoded exotoxins in the evolution of bacterial pathogens. *Future Microbiol.* **6**, 1461-1473.
- Clarke, T. E., Tari, L. W. & Vogel, H. J. (2001).** Structural biology of bacterial iron uptake systems. *Curr. Top Med. Chem.* **1**, 7-30.
- Clarridge, J. E. & Zighelboimdaum, S. (1985).** Isolation and characterization of 2 hemolytic phenotypes of *Vibrio damsela* associated with a fatal wound-infection. *J. Clin. Microbiol.* **21**, 302-306.
- Clock, S. A., Planet, P. J., Pérez, B. A. & Figurski, D. H. (2008).** Outer membrane components of the Tad (tight adherence) secreton of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J. Bacteriol.* **190**, 980-990.
- Coffey, J. A., Harris, R. L., Rutledge, M. L., Bradshaw, M. W. & Williams, T. W. (1986).** *Vibrio damsela*: another potentially virulent marine vibrio. *J. Infect. Dis.* **153**, 800-802.
- Cohen, S. N. (1993).** Bacterial plasmids: their extraordinary contribution to molecular genetics. *Gene* **135**, 67-76.
- Colmer, J. A., Fralick, J. A. & Hamood, A. N. (1998).** Isolation and characterization of a putative multidrug resistance pump from *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **27**, 63-72.
- Company, R., Sitja-Bobadilla, A., Pujalte, M. J., Garay, E., Álvarez-Pellitero, P. & Pérez-Sánchez, J. (1999).** Bacterial and parasitic pathogens in cultured common dentex, *Dentex dentex* L. *J. Fish Dis.* **22**, 299-309.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. & Marrie, T. J. (1987).** Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**, 435-464.
- Crosa, J. H., Schiewe, M. H. & Falkow, S. (1977).** Evidence for plasmid contribution to the virulence of fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.* **18**, 509-513.

**Cutter, D. L. & Kreger, A. S. (1990).** Cloning and expression of the damselysin gene from *Vibrio damsela*. *Infect. Immun.* **58**, 266-268.

**Chemani, C., Imberty, A., de Bentzmann, S., Pierre, M., Wimmerova, M., Guery, B. P. & Faure, K. (2009).** Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infect. Immun.* **77**, 2065-2075.

**Chen, C. Y., Wu, K. M., Chang, Y. C. & other authors (2003).** Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Res.* **13**, 2577-2587.

**Chen, Q., Fischer, J. R., Benoit, V. M., Dufour, N. P., Youderian, P. & Leong, J. M. (2008).** In vitro CpG methylation increases the transformation efficiency of *Borrelia burgdorferi* strains harboring the endogenous linear plasmid lp56. *J. Bacteriol.* **190**, 7885-7891.

**Chen, Y. C., Chang, M. C., Chuang, Y. C. & Jeang, C. L. (2004).** Characterization and virulence of hemolysin III from *Vibrio vulnificus*. *Curr. Microbiol.* **49**, 175-179.

**Christie, R., Atkins, N. E. & Munch-Petersen, E. (1944).** A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **22**, 197-200.

**Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000).** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **97**, 6640-6645.

**de Lorenzo, V., Wee, S., Herrero, M. & Neilands, J. B. (1987).** Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (*fur*) repressor. *J. Bacteriol.* **169**, 2624-2630.

**De, S. & Olson, R. (2011).** Crystal structure of the *Vibrio cholerae* cytolysin heptamer reveals common features among disparate pore-forming toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **108**, 7385-7390.

**Debellis, L., Diana, A., Arcidiacono, D., Fiorotto, R., Portincasa, P., Altomare, D. F., Spirli, C. & de Bernard, M. (2009).** The *Vibrio cholerae* cytolysin promotes chloride secretion from intact human intestinal mucosa. *PLoS One.* **4**, e5074.

**DeLeo, F. R. (2004).** Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. *Apoptosis* **9**, 399-413.

**do Vale, A., Ellis, A. E. & Silva, M. T. (2001).** Electron microscopic evidence that expression of capsular polysaccharide by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is dependent on iron availability and growth phase. *Dis. Aquat. Org.* **44**, 237-240.

**do Vale, A., Marques, F. & Silva, M. T. (2003).** Apoptosis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) neutrophils and macrophages induced by experimental infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish Shellfish Immunol.* **15**, 129-144.



do Vale, A., Silva, M. T., dos Santos, N. M. S., Nascimento, D. S., Reis-Rodrigues, P., Costa-Ramos, C., Ellis, A. E. & Azevedo, J. E. (2005). AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. *Mol. Microbiol.* **58**, 1025-1038.

Donnenberg, M. S. & Kaper, J. B. (1991). Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive selection suicide vector. *Infect. Immun.* **59**, 4310-4317.

Duperthuy, M., Binesse, J., Le Roux, F. & other authors (2010). The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environ. Microbiol.* **12**, 951-963.

Dryden, M., Legarde, M., Gottlieb, T., Brady, L. & Ghosh, H. K. (1989). *Vibrio damsela* wound infections in Australia. *Med. J. Aust.* **151**, 540-541.

Elkamel, A. A., Hawke, J. P., Henk, W. G. & Thune, R. L. (2003). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is capable of replicating in hybrid striped bass macrophages. *J. Aquat. Anim. Health* **15**, 175-183.

Enikeeva, F. N., Severinov, K. V. & Gelfand, M. S. (2010). Restriction-modification systems and bacteriophage invasion: who wins? *J. Theor. Biol.* **266**, 550-559.

Enninga, J. & Rosenshine, I. (2009). Imaging the assembly, structure and activity of type III secretion systems. *Cell Microbiol.* **11**, 1462-1470.

Erauso, G., Lakhal, F., Bidault-Toffin, A., Le Chevalier, P., Boulloc, P., Paillard, C. & Jacq, A. (2011). Evidence for the role of horizontal transfer in generating pVT1, a large mosaic conjugative plasmid from the clam pathogen, *Vibrio tapetis*. *PLoS One*. **6**, e16759.

Falkow, S., Isberg, R. R. & Portnoy, D. A. (1992). The interaction of bacteria with mammalian cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 333-363.

Fernández-López, R., Garcillan-Barcia, M. P., Revilla, C., Lázaro, M., Vielva, L. & de la Cruz, F. (2006). Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 942-966.

Fetherston, J. D., Bearden, S. W. & Perry, R. D. (1996). YbtA, an AraC-type regulator of the *Yersinia pestis* pesticin/yersiniabactin receptor. *Mol. Microbiol.* **22**, 315-325.

Fouz, B., Larsen, J. L., Nielsen, B., Barja, J. L. & Toranzo, A. E. (1992). Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot *Scophthalmus maximus* in Spain. *Dis. Aquat. Org.* **12**, 155-166.

- Fouz, B., Barja, J. L., Amaro, C., Rivas, C. & Toranzo, A. E. (1993).** Toxicity of the extracellular products of *Vibrio damsela* isolated from diseased fish. *Curr. Microbiol.* **27**, 341-347.
- Fouz, B., Toranzo, A. E., Biosca, E. G., Mazoy, R. & Amaro, C. (1994).** Role of iron in the pathogenicity of *Vibrio damsela* for fish and mammals. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**, 181-188.
- Fouz, B., Biosca, E. G. & Amaro, C. (1997).** High affinity iron-uptake systems in *Vibrio damsela*: role in the acquisition of iron from transferrin. *J. Appl. Microbiol.* **82**, 157-167.
- Fouz, B., Toranzo, A. E., Milán, M. & Amaro, C. (2000).** Evidence that water transmits the disease caused by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 531-535.
- Fraser, S. L., Purcell, B. K., Delagdo, B., Baker, A. E. & Whelen, A. C. (1997).** Rapidly fatal infection due to *Photobacterium (Vibrio) damsela*. *Clin. Infect. Dis.* **25**, 935-936.
- Fujioka, R. S., Greco, S. B., Cates, M. B. & Schroeder, J. P. (1988).** *Vibrio damsela* from wounds in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. *Dis. Aquat. Org.* **4**, 1-8.
- Garcia-Herrero, A., Peacock, R. S., Howard, S. P. & Vogel, H. J. (2007).** The solution structure of the periplasmic domain of the TonB system ExbD protein reveals an unexpected structural homology with siderophore-binding proteins. *Mol. Microbiol.* **66**, 872-889.
- Garcia-Rosado, E., Cano, I., Martín-Antonio, B., Labella, A., Manchado, M., Alonso, M. C., Castro, D. & Borrego, J. J. (2007).** Co-occurrence of viral and bacterial pathogens in disease outbreaks affecting newly cultured sparid fish. *Int. Microbiol.* **10**, 193-199.
- Garza-Gil, M. D., Varela-Lafuente, M. & Caballero-Míguez, G. (2009).** Price and production trends in the marine fish aquaculture in Spain. *Aquac. Res.* **40**, 274-281.
- Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breittmayer, V., Nicolas, J. L., Gauthier, M. & Christen, R. (1995).** Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko *et al.*) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 139-144.
- Gerlach, G., Janzen, S., Beier, D. & Gross, R. (2004).** Functional characterization of the BvgAS two-component system of *Bordetella holmesii*. *Microbiology* **150**, 3715-3729.
- Goldberg, M. B. (2001).** Actin-based motility of intracellular microbial pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 595-625.

- Goodell, K. H., Jordan, M. R., Graham, R., Cassidy, C. & Nasraway, S. A. (2004).** Rapidly advancing necrotizing fasciitis caused by *Photobacterium (Vibrio) damsela*: a hyperaggressive variant. *Crit. Care Med.* **32**, 278-281.
- Gouaux, E. (1998).** Roll out the barrel. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 931-932.
- Grant, J. R. & Stothard, P. (2008).** The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res.* **36**, 181-184.
- Griffiths, E. (1991).** Iron and bacterial virulence: a brief overview. *Biol. Met.* **4**, 7-13.
- Grimes, D. J., Colwell, R. R., Stemmler, J., Hada, H., Maneval, D., Hetrick, F. M., May, E. B., Jones, R. T. & Stoskopf, M. (1984a).** *Vibrio* species as agents of elasmobranch disease. *Helgol. Meeresunters* **37**, 309-315.
- Grimes, D. J., Stemmler, J., Hada, H., May, E. B., Maneval, D., Hetrick, F. M., Jones, R. T., Stoskopf, M. & Colwell, R. R. (1984b).** *Vibrio* species associated with mortality of sharks held in captivity. *Microb. Ecol.* **10**, 271-282.
- Groth, A. C. & Calos, M. P. (2004).** Phage integrases: biology and applications. *J. Mol. Biol.* **335**, 667-678.
- Grys, T. E., Walters, L. L. & Welch, R. A. (2006).** Characterization of the StcE protease activity of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* **188**, 4646-4653.
- Guerin, I. & de Chastellier, C. (2000).** Pathogenic mycobacteria disrupt the macrophage actin filament network. *Infect. Immun.* **68**, 2655-2662.
- Hacker, J. (1992).** Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. *Can. J. Microbiol.* **38**, 720-727.
- Hamaguchi, M., Usuki, H. & Kusuda, R. (1991).** *Pasteurella piscicida* Infection in yatabe blenny, *Pictiblennius yatabei*. *Fish Pathol.* **26**, 93-94.
- Hanlon, R. T., Forsythe, J. W., Cooper, K. M., Dinuzzo, A. R., Folse, D. S. & Kelly, M. T. (1984).** Fatal penetrating skin ulcers in laboratory-reared octopuses. *J. Invertebr. Pathol.* **44**, 67-83.
- Hantke, K. (1987).** Selection procedure for deregulated iron transport mutants (Fur) in *Escherichia coli* K 12: Fur not only affects iron metabolism. *Mol. Gen. Genet.* **210**, 135-139.
- Hawke, J. P., Plakas, S. M., Minton, R. V., McPhearson, R. M., Snider, T. G. & Guarino, A. M. (1987).** Fish pasteurellosis of cultured striped bass (*Morone saxatilis*) in coastal Alabama. *Aquaculture* **65**, 193-204.

- Hawke, J. P. (1996).** Importance of a siderophore in the pathogenesis and virulence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in hybrid-striped bass (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops*). PhD Dissertation Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Baton Rouge, LA.
- He, S. Y. (1998).** Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 363-392.
- He, Y. & Olson, R. (2009).** Three-dimensional structure of the detergent-solubilized *Vibrio cholerae* cytolysin (VCC) heptamer by electron cryomicroscopy. *J. Struct. Biol.* **169**, 6-13.
- Hebert, G. A. & Hancock, G. A. (1985).** Synergistic hemolysis exhibited by species of staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **22**, 409-415.
- Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C. & other authors (2000).** DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**, 477-483.
- Herrero, M., de Lorenzo, V. & Timmis, K. N. (1990).** Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 6557-6567.
- Hirono, I. & Aoki, T. (1993).** Cloning and characterization of three hemolysin genes from *Aeromonas salmonicida*. *Microb. Pathog.* **15**, 269-282.
- Hwang, J., Zhong, X. & Tai, P. C. (1997).** Interactions of dedicated export membrane proteins of the colicin V secretion system: CvaA, a member of the membrane fusion protein family, interacts with CvaB and TolC. *J. Bacteriol.* **179**, 6264-6270.
- Hwang, W., Lee, N. Y., Kim, J., Lee, M. A., Kim, K. S., Lee, K. H. & Park, S. J. (2011).** Functional characterization of EpsC, a component of the type II secretion system, in the pathogenicity of *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **79**, 4068-4080.
- Iacovache, I., van der Goot, F. G. & Pernot, L. (2008).** Pore formation: an ancient yet complex form of attack. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 1611-1623.
- Isberg, R. R., Voorhis, D. L. & Falkow, S. (1987).** Identification of Invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* **50**, 769-778.
- Ivanov, I. T. (2007).** Allometric dependence of the life span of mammal erythrocytes on thermal stability and sphingomyelin content of plasma membranes. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **147**, 876-884.
- Jacques, M., Kobisch, M., Belanger, M. & Dugal, F. (1993).** Virulence of capsulated and noncapsulated isolates of *Pasteurella multocida* and their adherence to porcine respiratory tract cells and mucus. *Infect. Immun.* **61**, 4785-4792.

- Jakubowski, S. J., Krishnamoorthy, V. & Christie, P. J. (2003).** *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 protein participates in formation of VirB7 and VirB9 complexes required for type IV secretion. *J. Bacteriol.* **185**, 2867-2878.
- Janssen, W. A. & Surgalla, M. J. (1968).** Morphology, physiology, and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch. (*Roccus americanus*). *J. Bacteriol.* **96**, 1606-1610.
- Jenal, U. & Malone, J. (2006).** Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **40**, 385-407.
- Juíz-Rio, S., Osorio, C. R., de Lorenzo, V. & Lemos, M. L. (2005).** Subtractive hybridization reveals a high genetic diversity in the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: evidence of a SXT-like element. *Microbiology* **151**, 2659-2669.
- Jurado, R. L. (1997).** Iron, infections, and anemia of inflammation. *Clin. Infect. Dis.* **25**, 888-895.
- Kammler, M., Schon, C. & Hantke, K. (1993).** Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 6212-6219.
- Kanchanopas-Barnette, P., Labella, A., Alonso, C. M., Manchado, M., Castro, D. & Borrego, J. J. (2009).** The first isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from asian seabass (*Lates calcarifer*). *Fish Pathol.* **44**, 47-50.
- Kang, H. J., Choi, S. W., Heo, D. H., Jeong, M. Y., Sung, H. C. & Yun, C. W. (2008).** A novel role for thioredoxin reductase in the iron metabolism of *S. cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **371**, 63-68.
- Karaolis, D. K., Johnson, J. A., Bailey, C. C., Boedeker, E. C., Kaper, J. B. & Reeves, P. R. (1998).** A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**, 3134-3139.
- Kashimoto, T., Ueno, S., Koga, T., Fukudome, S., Ehara, H., Komai, M., Sugiyama, H. & Susa, N. (2009).** The aromatic ring of phenylalanine 334 is essential for oligomerization of *Vibrio vulnificus* hemolysin. *J. Bacteriol.* **192**, 568-574.
- Keenleyside, W. J., Clarke, A. J. & Whitfield, C. (2001).** Identification of residues involved in catalytic activity of the inverting glycosyl transferase WbbE from *Salmonella enterica* serovar *borreze*. *J. Bacteriol.* **183**, 77-85.
- Kim, H. R., Kim, J. W., Lee, M. K. & Kim, J. G. (2009).** Septicemia progressing to fatal hepatic dysfunction in an cirrhotic patient after oral ingestion of *Photobacterium damsela*: a case report. *Infection* **37**, 555-556.

- Kim, M. J., Hirono, I., Kurokawa, K., Maki, T., Hawke, J., Kondo, H., Santos, M. D. & Aoki, T. (2008).** Complete DNA sequence and analysis of the transferable multiple-drug resistance plasmids (R Plasmids) from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolates collected in Japan and the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 606-611.
- Kim, S., Malinverni, J. C., Sliz, P., Silhavy, T. J., Harrison, S. C. & Kahne, D. (2007).** Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. *Science* **317**, 961-964.
- Kimura, B., Hokimoto, S., Takahashi, H. & Fujii, T. (2000).** *Photobacterium histaminum* Okuzumi *et al.* 1994 is a later subjective synonym of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (Love *et al.* 1981) Smith *et al.* 1991. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 1339-1342.
- Kimura, B., Takahashi, H., Hokimoto, S., Tanaka, Y. & Fujii, T. (2009).** Induction of the histidine decarboxylase genes of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (formally *P. histaminum*) at low pH. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 485-497.
- Klemm, P., Vejborg, R. M. & Hancock, V. (2010).** Prevention of bacterial adhesion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**, 451-459.
- Knight-Madden, J. F. M., Barton, M., Gandretti, N. & Nicholson, A. M. (2005).** *Photobacterium damsela* bacteremia in a child with sickle-cell disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**, 654-655.
- Kothary, M. H. & Kreger, A. S. (1985).** Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by *Vibrio damsela*. *Infect. Immun.* **49**, 25-31.
- Krasilnikov, O. V., Merzlyak, P. G., Lima, V. L., Zitzer, A. O., Valeva, A. & Yuldasheva, L. N. (2007).** Pore formation by *Vibrio cholerae* cytolysin requires cholesterol in both monolayers of the target membrane. *Biochimie.* **89**, 271-277.
- Kreger, A. S. (1984).** Cytolytic activity and virulence of *Vibrio damsela*. *Infect. Immun.* **44**, 326-331.
- Kreger, A. S., Bernheimer, A. W., Etkin, L. A. & Daniel, L. W. (1987).** Phospholipase D activity of *Vibrio damsela* cytolysin and its interaction with sheep erythrocytes. *Infect. Immun.* **55**, 3209-3212.
- Labella, A., Vida, M., Alonso, M. C., Infante, C., Cárdenas, S., López-Romalde, S., Manchado, M. & Borrego, J. J. (2006).** First isolation of *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* from cultured redbanded seabream, *Pagrus auriga Valenciennes*, in Spain. *J. Fish Dis.* **29**, 175-179.

- Labella, A., Sánchez-Montes, N., Berbel, C., Aparicio, M., Castro, D., Manchado, M. & Borrego, J. J. (2010).** Toxicity of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* strains isolated from new cultured marine fish. *Dis. Aquat. Org.* **92**, 31-40.
- Lee, C. T., Amaro, C., Wu, K. M., Valiente, E., Chang, Y. F., Tsai, S. F., Chang, C. H. & Hor, L. I. (2008).** A common virulence plasmid in biotype 2 *Vibrio vulnificus* and its dissemination aided by a conjugal plasmid. *J. Bacteriol.* **190**, 1638-1648.
- Lemos, M. L., Salinas, P., Toranzo, A. E., Barja, J. L. & Crosa, J. H. (1988).** Chromosome mediated iron uptake system in pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **170**, 1920-1925.
- Lemos, M. L. & Osorio, C. R. (2007).** Heme, an iron supply for vibrios pathogenic for fish. *Biometals* **20**, 615-626.
- Lesmana, M., Subekti, D., Tjaniadi, P. & Pazzaglia, G. (1994).** Modified CAMP test for biogrouping *Vibrio cholerae* O1 strains and distinguishing them from strains of *V. cholerae* non-O1. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 235-237.
- Lesmana, M., Albert, M. J., Subekti, D., Richie, E., Tjaniadi, P., Walz, S. E. & Lebron, C. I. (1996).** Simple differentiation of *Vibrio cholerae* O139 from *V. cholerae* O1 and non-O1, non-O139 by modified CAMP test. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1038-1040.
- Levin, B. R. & Eden, C. S. (1990).** Selection and evolution of virulence in bacteria: an ecumenical excursion and modest suggestion. *Parasitology* **100**, 103-115.
- Lin, H. T., Bavro, V. N., Barrera, N. P., Frankish, H. M., Velamakanni, S., van Veen, H. W., Robinson, C. V., Borges-Walmsley, M. I. & Walmsley, A. R. (2009a).** MacB ABC transporter is a dimer whose ATPase activity and macrolide-binding capacity are regulated by the membrane fusion protein MacA. *J. Biol. Chem.* **284**, 1145-1154.
- Lin, M. H., Hsu, T. L., Lin, S. Y., Pan, Y. J., Jan, J. T., Wang, J. T., Khoo, K. H. & Wu, S. H. (2009b).** Phosphoproteomics of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 reveals a tight link between tyrosine phosphorylation and virulence. *Mol. Cell Proteomics* **8**, 2613-2623.
- Linder, R. (1984).** Alteration of mammalian membranes by the cooperative and antagonistic actions of bacterial proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **779**, 423-435.
- Linhartova, I., Bumba, L., Masin, J. & other authors (2010).** RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 1076-1112.
- Liu, P. C., Cheng, C. F., Chang, C. H. & other authors (2011a).** Highly virulent *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated from Taiwan paradise fish, *Macropodus opercularis* (L.), in Taiwan. *Afr. J. Microbiol. Res.* **5**, 2107-2113.

- Liu, P. C., Chuang, W. H. & Lee, K. K. (2011b).** Purification of a toxic metalloprotease produced by the pathogenic *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated from cobia (*Rachycentron canadum*). *Zeitschrift fur naturforschung (section C): a journal of biosciences* **66**, 287-295.
- Liu, P. V. (1957).** Survey of hemolysin production among species of *Pseudomonads*. *J. Bacteriol.* **74**, 718-727.
- Lohner, S., Walev, I., Boukhallouk, F., Palmer, M., Bhakdi, S. & Valeva, A. (2009).** Pore formation by *Vibrio cholerae* cytolysin follows the same archetypical mode as beta-barrel toxins from Gram-positive organisms. *FASEB J.* **23**, 2521-2528.
- López-Doriga, M. V., Barnes, A. C., dos Santos, N. M. S. & Ellis, A. E. (2000).** Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: evidence for receptor specificity, and effect of capsule and serum. *Microbiology* **146**, 21-30.
- Love, M., Teebkenfisher, D., Hose, J. E., Farmer, J. J., Hickman, F. W. & Fanning, G. R. (1981).** *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. *Science* **214**, 1139-1140.
- MacDonell, M. T. & Colwell, R. R. (1984).** The nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from *Vibrio marinus*. *Microbiol. Sci.* **1**, 229-231.
- Magariños, B., Romalde, J. L., Bandín, I., Fouz, B. & Toranzo, A. E. (1992a).** Phenotypic, antigenic, and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3316-3322.
- Magariños, B., Santos, Y., Romalde, J. L., Rivas, C., Barja, J. L. & Toranzo, A. E. (1992b).** Pathogenic activities of live cells and extracellular products of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 2491-2498.
- Magariños, B., Romalde, J. L., Barja, J. L. & Toranzo, A. E. (1994a).** Evidence of a dormant but infective state of the fish pathogen *Pasteurella piscicida* in seawater and sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 180-186.
- Magariños, B., Romalde, J. L., Lemos, M. L., Barja, J. L. & Toranzo, A. E. (1994b).** Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2990-2998.
- Magariños, B., Bonet, R., Romalde, J. L., Martínez, M. J., Congregado, F. & Toranzo, A. E. (1996a).** Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. *Microb. Pathog.* **21**, 289-297.
- Magariños, B., Romalde, J. L., Noya, M., Barja, J. L. & Toranzo, A. E. (1996b).** Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *FEMS Microbiol. Lett.* **138**, 29-34.



**Magariños, B., Toranzo, A. E., Barja, J. L. & Romalde, J. L. (2000).** Existence of two geographically-linked clonal lineages in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* evidenced by random amplified polymorphic DNA analysis. *Epidemiol. Infect.* **125**, 213-219.

**Mahillon, J., Leonard, C. & Chandler, M. (1999).** IS elements as constituents of bacterial genomes. *Res. Microbiol.* **150**, 675-687.

**Malm, S., Tiffert, Y., Micklinghoff, J. & other authors (2009).** The roles of the nitrate reductase NarGHJ, the nitrite reductase NirBD and the response regulator GlnR in nitrate assimilation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* **155**, 1332-1339.

**Marsh, J. W. & Taylor, R. K. (1999).** Genetic and transcriptional analyses of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin type 4 pilus gene locus. *J. Bacteriol.* **181**, 1110-1117.

**Mazumdar, B., Ganguly, S., Ghosh, A. N. & Banerjee, K. K. (2011).** The role of C-terminus carbohydrate-binding domain of *Vibrio cholerae* haemolysin/cytolysin in the conversion of the pre-pore beta-barrel oligomer to a functional diffusion channel. *Indian. J. Med. Res.* **133**, 131-137.

**Merino, S., Aguilar, A., Nogueras, M. M., Regue, M., Swift, S. & Tomas, J. M. (1999).** Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34. *Infect. Immun.* **67**, 4008-4013.

**Mey, A. R., Wyckoff, E. E., Kanukurthy, V., Fisher, C. R. & Payne, S. M. (2005).** Iron and fur regulation in *Vibrio cholerae* and the role of *fur* in virulence. *Infect. Immun.* **73**, 8167-8178.

**Miller, J. H. (1992).** A short course in Bacterial Genetics. Plainview NY: Cold Spring Laboratory Press.

**Morris, J. G., Wilson, R., Hollis, D. G., Weaver, R. E., Miller, H. G., Tacket, C. O., Hickman, F. W. & Blake, P. A. (1982).** Illness caused by *Vibrio damsela* and *Vibrio hollisae*. *Lancet* **1**, 1294-1297.

**Mouriño, S., Osorio, C. R. & Lemos, M. L. (2004).** Characterization of heme uptake cluster genes in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **186**, 6159-6167.

**Moxon, E. R. & Kroll, J. S. (1990).** The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **150**, 65-85.

**Muga, A. & Moro, F. (2008).** Thermal adaptation of heat shock proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* **9**, 552-566.

**Nagamune, K., Yamamoto, K. & Honda, T. (1997).** Intramolecular chaperone activity of the pro-region of *Vibrio cholerae* El Tor cytolysin. *J. Biol. Chem.* **272**, 1338-1343.

- Naka, H., Hirono, I. & Aoki, T. (2007).** Cloning and characterization of *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* phospholipase: an enzyme that shows haemolytic activity. *J. Fish Dis.* **30**, 681-690.
- Nakamura, Y., Uchihira, M., Ichimiya, M., Morita, K. & Muto, M. (2008).** Necrotizing fasciitis of the leg due to *Photobacterium damsela*. *J. Dermatol.* **35**, 44-45.
- Nicholson, T. F., Watts, K. M. & Hunstad, D. A. (2009).** OmpA of uropathogenic *Escherichia coli* promotes postinvasion pathogenesis of cystitis. *Infect. Immun.* **77**, 5245-5251.
- Nikaido, H. (1994).** Maltose transport system of *Escherichia coli*: an ABC-type transporter. *FEBS Lett.* **346**, 55-58.
- Nishino, K. (2012).** Physiological role of bacterial multidrug efflux pumps. *Yakugaku zasshi-journal of the pharmaceutical society of Japan* **132**, 45-50.
- Notenboom, V., Boraston, A. B., Williams, S. J., Kilburn, D. G. & Rose, D. R. (2002).** High-resolution crystal structures of the lectin-like xylan binding domain from *Streptomyces lividans* xylanase 10A with bound substrates reveal a novel mode of xylan binding. *Biochemistry* **41**, 4246-4254.
- Noya, M., Magariños, B. & Lamas, J. (1995).** Interactions between peritoneal exudate cells (Pecs) of gilthead seabream (*Sparus aurata*) and *Pasteurella piscicida*: a morphological study. *Aquaculture* **131**, 11-21.
- Obendorf, D. L., Carson, J. & McManus, T. J. (1987).** *Vibrio damsela* Infection in a stranded leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *J. Wildl. Dis.* **23**, 666-668.
- Olson, R. & Gouaux, E. (2003).** *Vibrio cholerae* cytolysin is composed of an alpha-hemolysin-like core. *Protein Sci.* **12**, 379-383.
- Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J. & other authors (2001).** Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **98**, 12215-12220.
- Orskov, F. & Orskov, I. (1992).** *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J. Microbiol.* **38**, 699-704.
- Orth, D., Grif, K., Dierich, M. P. & Wurzner, R. (2007).** Variability in tellurite resistance and the *ter* gene cluster among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans, animals and food. *Res. Microbiol.* **158**, 105-111.
- Osorio, C. R., Romalde, J. L., Barja, J. L. & Toranzo, A. E. (2000).** Presence of phospholipase-D (*dly*) gene coding for damselysin production is not a pre-requisite for pathogenicity in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Microb. Pathog.* **28**, 119-126.

**Osorio, C. R., Lemos, M. L. & Braun, V. (2004).** Identification of Fur regulated genes in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* using the Fur titration assay. *Biometals* **17**, 725-733.

**Osorio, C. R., Juiz-Río, S. & Lemos, M. L. (2006).** A siderophore biosynthesis gene cluster from the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is structurally and functionally related to the *Yersinia* high-pathogenicity island. *Microbiology* **152**, 3327-3341.

**Osorio, C. R., Marrero, J., Wozniak, R. A., Lemos, M. L., Burrus, V. & Waldor, M. K. (2008).** Genomic and functional analysis of ICEPdaSpa1, a fish-pathogen-derived SXT-related integrating conjugative element that can mobilize a virulence plasmid. *J. Bacteriol.* **190**, 3353-3361.

**Osorio, C. R., Juiz-Río, S. & Lemos, M. L. (2010).** The ABC-transporter *hutCD* genes of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* are essential for haem utilization as iron source and are expressed during infection in fish. *J. Fish Dis.* **33**, 649-655.

**Pagel, M., Simonet, V., Li, J., Lallemand, M., Lauman, B. & Delcour, A. H. (2007).** Phenotypic characterization of pore mutants of the *Vibrio cholerae* porin OmpU. *J. Bacteriol.* **189**, 8593-8600.

**Parales, R. E. & Harwood, C. S. (1993).** Construction and use of a new broad host-range LacZ transcriptional fusion vector, pHRP309, for Gram(-) bacteria. *Gene* **133**, 23-30.

**Patel, H. M. & Walsh, C. T. (2001).** In vitro reconstitution of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide synthesis of pyochelin: characterization of backbone tailoring thiazoline reductase and N-methyltransferase activities. *Biochemistry* **40**, 9023-9031.

**Paul, K. & Chattopadhyay, K. (2011).** Unfolding distinguishes the *Vibrio cholerae* cytolysin precursor from the mature form of the toxin. *Biochemistry* **50**, 3936-3945.

**Pedersen, K., Dalsgaard, I. & Larsen, J. L. (1997).** *Vibrio damsela* associated with diseased fish in Denmark. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3711-3715.

**Pedersen, K., Skall, H. F., Lassen-Nielsen, A. M., Bjerrum, L. & Olesen, N. J. (2009).** *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging pathogen in Danish rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), mariculture. *J. Fish. Dis.* **32**, 465-472.

**Pérez-tirse, J., Levine, J. F. & Mecca, M. (1993).** *Vibrio damsela*: a cause of fulminant septicemia. *Arch. Intern. Med.* **153**, 1838-1840.

**Pillai, L., Sha, J., Erova, T. E., Fadl, A. A., Khajanchi, B. K. & Chopra, A. K. (2006).** Molecular and functional characterization of a ToxR-regulated lipoprotein from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* **74**, 3742-3755.

- Pizarro-Cerdá, J. & Cossart, P. (2006).** Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* **124**, 715-727.
- Pope, C. D., O'Connell, W. & Cianciotto, N. P. (1996).** *Legionella pneumophila* mutants that are defective for iron acquisition and assimilation and intracellular infection. *Infect. Immun.* **64**, 629-636.
- Poulos, C., Bakopoulos, V., Zolota, V. & Dimitriadis, G. J. (2004).** Histopathological findings after sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) exposure to extracellular products of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* produced in vivo. *Aquac. Res.* **35**, 931-936.
- Prieto, A. I., Hernández, S. B., Cota, I., Pucciarelli, M. G., Orlov, Y., Ramos-Morales, F., García-del Portillo, F. & Casadesus, J. (2009).** Roles of the outer membrane protein AsmA of *Salmonella enterica* in the control of *marRAB* expression and invasion of epithelial cells. *J. Bacteriol.* **191**, 3615-3622.
- Pujalte, M. J., Sitja-Bobadilla, A., Álvarez-Pellitero, P. & Garay, E. (2003).** Carriage of potentially fish-pathogenic bacteria in *Sparus aurata* cultured in mediterranean fish farms. *Dis. Aquat. Org.* **54**, 119-126.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., Heidelberg, J. F. & Mekalanos, J. J. (2006).** Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **103**, 1528-1533.
- Records, A. R. (2011).** The type VI secretion system: a multipurpose delivery system with a phage-like machinery. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**, 751-757.
- Rigos, G. & Katharios, P. (2010).** Pathological obstacles of newly-introduced fish species in mediterranean mariculture: a review. *Rev. Fish. Biol. Fish.* **20**, 47-70.
- Río, S. J., Osorio, C. R. & Lemos, M. L. (2005).** Heme uptake genes in human and fish isolates of *Photobacterium damsela*: existence of *hutA* pseudogenes. *Arch. Microbiol.* **183**, 347-358.
- Ripio, M. T., Geoffroy, C., Domínguez, G., Alouf, J. E. & Vázquez-Boland, J. A. (1995).** The sulphhydryl-activated cytolysin and a sphingomyelinase C are the major membrane-damaging factors involved in cooperative (CAMP-like) haemolysis of *Listeria spp.* *Res. Microbiol.* **146**, 303-313.
- Roberson, E. B. & Firestone, M. K. (1992).** Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas sp.* *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1284-1291.
- Roberts, I. S., Saunders, F. K. & Boulnois, G. J. (1989).** Bacterial capsules and interactions with complement and phagocytes. *Biochem. Soc. Trans.* **17**, 462-464.

**Rodgers, C. J. & Furones, M. D. (1998).** Disease problems in cultured marine fish in the Mediterranean. *Fish Pathol.* **33**, 157-164.

**Romalde, J. L. (2002).** *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *Int. Microbiol.* **5**, 3-9.

**Rosok, O. & Sioud, M. (2007).** Discovery of differentially expressed genes: technical considerations. *Methods. Mol. Biol.* **360**, 115-129.

**Ryan, D. & Colleran, E. (2002).** Arsenical resistance in the IncHI2 plasmids. *Plasmid* **47**, 234-240.

**Sakata, T., Matsuura, M. & Shimokawa, Y. (1989).** Characteristics of *Vibrio damsela* isolated from diseased yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **55**, 135-141.

**Salyers, A. A. & Whitt, D. D. (1994).** Bacterial pathogenesis: a molecular approach. *ASM Press, Washington, DC*.

**Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001).** Molecular cloning: a laboratory manual. *Ed 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*.

**Sanders, M. E. (1988).** Phage resistance in lactic acid bacteria. *Biochimie.* **70**, 411-422.

**Sauer, M., Hantke, K. & Braun, V. (1990).** Sequence of the *fhuE* outer-membrane receptor gene of *Escherichia coli* K12 and properties of mutants. *Mol. Microbiol.* **4**, 427-437.

**Schaufuss, P., Brasch, J. & Steller, U. (2005).** Dermatophytes can trigger cooperative (CAMP-like) haemolytic reactions. *Br. J. Dermatol.* **153**, 584-590.

**Schleifer, K. H. & Stackebrandt, E. (1983).** Molecular systematics of prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**, 143-187.

**Schubert, S., Rakin, A. & Heesemann, J. (2004).** The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**, 83-94.

**Schweinitzer, T. & Josenhans, C. (2010).** Bacterial energy taxis: a global strategy? *Arch. Microbiol.* **192**, 507-520.

**Schwyn, B. & Neilands, J. B. (1987).** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**, 47-56.

**Serracca, L., Ercolini, C., Rossini, I., Battistini, R., Giorgi, I. & Prearo, M. (2011).** Occurrence of both subspecies of *Photobacterium damsela* in mullets collected in the river Magra (Italy). *Can. J. Microbiol.* **57**, 437-440.

- Shin, J. H., Shin, M. G., Suh, S. P., Ryang, D. W., Rew, J. S. & Nolte, F. S. (1996).** Primary *Vibrio damsela* septicemia. *Clin. Infect. Dis.* **22**, 856-857.
- Smillie, C., Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C. & de la Cruz, F. (2009).** Mobility of Plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 434-452.
- Smith, S. K., Sutton, D. C., Fuerst, J. A. & Reichelt, J. L. (1991).** Evaluation of the genus *Listonella* and reassignment of *Listonella damsela* (Love *et al.*) MacDonell and Colwell to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* comb. nov. with an emended description. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 529-534.
- Snider, J. & Houry, W. A. (2006).** MoxR AAA+ ATPases: a novel family of molecular chaperones? *J. Struct. Biol.* **156**, 200-209.
- Snieszko, S. F., Bullock, G. L., Hollis, E. & Boone, J. G. (1964).** *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *J. Bacteriol.* **88**, 1814-1815.
- Song, Y. L., Cheng, W. & Wang, C. H. (1993).** Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infectious for cultured shrimp in Taiwan. *J. Invertebr. Pathol.* **61**, 24-31.
- Stojiljkovic, I., Baumber, A. J. & Hantke, K. (1994).** Fur regulon in Gram-negative bacteria: identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a Fur titration assay. *J. Mol. Biol.* **240**, 271-271.
- Stojiljkovic, I. & Perkins-Balding, D. (2002).** Processing of heme and heme-containing proteins by bacteria. *DNA Cell Biol.* **21**, 281-295.
- Tabor, S. & Richardson, C. C. (1985).** A bacteriophage-T7 RNA-polymerase promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **82**, 1074-1078.
- Takahashi, H., Miya, S., Kimura, B., Yamane, K., Arakawa, Y. & Fujii, T. (2008).** Difference of genotypic and phenotypic characteristics and pathogenicity potential of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* between clinical and environmental isolates from Japan. *Microb. Pathog.* **45**, 150-158.
- Tang, W. M. & Wong, J. W. K. (1999).** Necrotizing fasciitis caused by *Vibrio damsela*. *Orthopedics* **22**, 443-444.
- Taylor, D. E. (1999).** Bacterial tellurite resistance. *Trends Microbiol.* **7**, 111-115.
- Thanassi, D. G., Cheng, L. W. & Nikaido, H. (1997).** Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 2512-2518.
- Tilley, S. J. & Saibil, H. R. (2006).** The mechanism of pore formation by bacterial toxins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 230-236.

- Tolmasky, M. E., Wertheimer, A. M., Actis, L. A. & Crosa, J. H. (1994).** Characterization of the *Vibrio anguillarum fur* gene: role in regulation of expression of the FatA outer membrane protein and catechols. *J. Bacteriol.* **176**, 213-220.
- Tomich, M., Planet, P. J. & Figurski, D. H. (2007).** The *tad* locus: postcards from the widespread colonization island. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 363-375.
- Toranzo, A. E., Barja, J. L., Colwell, R. R. & Hetrick, F. M. (1983).** Characterization of plasmids in bacterial fish pathogens. *Infect. Immun.* **39**, 184-192.
- Toranzo, A. E., Barreiro, S., Casal, J. F., Figueras, A., Magariños, B. & Barja, J. L. (1991).** Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): 1st report in Spain. *Aquaculture* **99**, 1-15.
- Toranzo, A. E., Magariños, B. & Romalde, J. L. (2005).** A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* **246**, 37-61.
- Ueki, N., Kayano, Y. & Muroga, K. (1990).** *Pasteurella piscicida* infection in juvenile red grouper (*Epinephelus akaara*). *Fish Pathol.* **25**, 43-44.
- Uhl, M. A. & Miller, J. F. (1996).** Central role of the BvgS receiver as a phosphorylated intermediate in a complex two-component phosphorelay. *J. Biol. Chem.* **271**, 33176-33180.
- Valeva, A., Walev, I., Boukhallouk, F. & other authors (2005).** Identification of the membrane penetrating domain of *Vibrio cholerae* cytolysin as a beta-barrel structure. *Mol. Microbiol.* **57**, 124-131.
- Valeva, A., Hellmann, N., Walev, I. & other authors (2006).** Evidence that clustered phosphocholine head groups serve as sites for binding and assembly of an oligomeric protein pore. *J. Biol. Chem.* **281**, 26014-26021.
- Vaseeharan, B., Sundararaj, S., Murugan, T. & Chen, J. C. (2007).** *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* associated with diseased black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) fabricei in India. *Lett. Appl. Microbiol.* **45**, 82-86.
- Vezzi, A., Campanaro, S., D'Angelo, M. & other authors (2005).** Life at depth: *Photobacterium profundum* genome sequence and expression analysis. *Science* **307**, 1459-1461.
- Viswanathan, V. K., Edelstein, P. H., Pope, C. D. & Cianciotto, N. P. (2000).** The *Legionella pneumophila iraAB* locus is required for iron assimilation, intracellular infection, and virulence. *Infect. Immun.* **68**, 1069-1079.
- Wandersman, C. & Delepelaire, P. (1990).** TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **87**, 4776-4780.

- Wang, R. F. & Kushner, S. R. (1991).** Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene-expression in *Escherichia coli*. *Gene* **100**, 195-199.
- Wang, Y., Xu, Z., Jia, A., Chen, J., Mo, Z. & Zhang, X. (2009).** Genetic diversity between two *Vibrio anguillarum* strains exhibiting different virulence by suppression subtractive hybridization. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **49**, 363-371.
- Watmough, N. J., Field, S. J., Hughes, R. J. & Richardson, D. J. (2009).** The bacterial respiratory nitric oxide reductase. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 392-399.
- Whitfield, C. & Valvano, M. A. (1993).** Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **35**, 135-246.
- Winston, J. L., Toth, S. I., Roe, B. A. & Dyer, D. W. (1996).** Cloning and characterization of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* gene encoding a heat-shock protein 90 homologue. *Gene* **179**, 199-204.
- Worst, D. J., Gerrits, M. M., Vandenbroucke-Grauls, C. M. & Kusters, J. G. (1998).** *Helicobacter pylori* ribBA-mediated riboflavin production is involved in iron acquisition. *J. Bacteriol.* **180**, 1473-1479.
- Wu, L. N., Lin, X. M., Wang, F. P., Ye, D. Z., Xiao, X., Wang, S. Y. & Peng, X. X. (2006).** OmpW and OmpV are required for NaCl regulation in *Photobacterium damsela*. *J. Proteome Res.* **5**, 2250-2257.
- Yamamoto, K., Ichinose, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Nakata, A., Iwanaga, M., Honda, T. & Miwatani, T. (1990a).** Two-step processing for activation of the cytolysin/hemolysin of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor: nucleotide sequence of the structural gene (*hlyA*) and characterization of the processed products. *Infect. Immun.* **58**, 4106-4116.
- Yamane, K., Asato, J., Kawade, N., Takahashi, H., Kimura, B. & Arakawa, Y. (2004).** Two cases of fatal necrotizing fasciitis caused by *Photobacterium damsela* in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 1370-1372.
- Yuen, K. Y., Ma, L., Wong, S. S. Y. & Ng, W. F. (1993).** Fatal necrotizing fasciitis due to *Vibrio damsela*. *Scand. J. Infect. Dis.* **25**, 659-661.
- Yamamoto, K., Wright, A. C., Kaper, J. B. & Morris, J. G., Jr. (1990b).** The cytolysin gene of *Vibrio vulnificus*: sequence and relationship to the *Vibrio cholerae* E1 Tor hemolysin gene. *Infect. Immun.* **58**, 2706-2709.
- Yu, H. N., Lee, Y. R., Park, K. H. & other authors (2007).** Membrane cholesterol is required for activity of *Vibrio vulnificus* cytolysin. *Arch. Microbiol.* **187**, 467-473.



**Zhang, D., Takahashi, J., Seno, T., Tani, Y. & Honda, T. (1999).** Analysis of receptor for *Vibrio cholerae* El tor hemolysin with a monoclonal antibody that recognizes glycophorin B of human erythrocyte membrane. *Infect. Immun.* **67**, 5332-5337.

**Zhang, X. J., Qin, G. M., Bing, X. W., Yan, B. L. & Bi, K. R. (2011).** Phenotypic and molecular characterization of *Photobacterium damsela*, a pathogen of the cultured tongue sole *Cynoglossus semilaevis* in China. *N Z J Mar Freshw Res* **45**, 1-13.

**Zhao, D. H., Sun, J. J., Liu, L., Zhao, H. H., Wang, H. F., Liang, L. Q., Liu, L. B. & Li, G. F. (2009).** Characterization of two phenotypes of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolated from diseased juvenile *Trachinotus ovatus* reared in cage mariculture. *J. World Aquacult. Soc.* **40**, 281-289.

**Zhou, C., Yang, Y. & Jong, A. Y. (1990).** Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* **8**, 172-173.

**Zitzer, A., Zitzer, O., Bhakdi, S. & Palmer, M. (1999).** Oligomerization of *Vibrio cholerae* cytolysin yields a pentameric pore and has a dual specificity for cholesterol and sphingolipids in the target membrane. *J. Biol. Chem.* **274**, 1375-1380.

**Zitzer, A., Bittman, R., Verbicky, C. A., Erukulla, R. K., Bhakdi, S., Weis, S., Valeva, A. & Palmer, M. (2001).** Coupling of cholesterol and cone-shaped lipids in bilayers augments membrane permeabilization by the cholesterol-specific toxins streptolysin O and *Vibrio cholerae* cytolysin. *J. Biol. Chem.* **276**, 14628-14633.



## VIII. Anexo



## The *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* Hemolysins Damselysin and HlyA Are Encoded within a New Virulence Plasmid<sup>∇</sup>

Amable J. Rivas, Miguel Balado, Manuel L. Lemos, and Carlos R. Osorio\*

Departamento de Microbiología e Parasitología, Instituto de Acuicultura, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Galicia, Spain

Received 24 May 2011/Returned for modification 9 June 2011/Accepted 16 August 2011

*Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (formerly *Vibrio damsela*) is a marine bacterium that causes infections and fatal disease in a wide range of marine animals and in humans. Highly hemolytic strains produce damselysin (Dly), a cytotoxin encoded by the *dly* gene that is lethal for mice and has hemolytic activity. We found that Dly is encoded in the highly hemolytic strain RM-71 within a 153,429-bp conjugative plasmid that we dubbed pPHDD1. In addition to Dly, pPHDD1 also encodes a homologue of the pore-forming toxin HlyA. We found a direct correlation between presence of pPHDD1 and a strong hemolytic phenotype in a collection of *P. damsela* subsp. *damsela* isolates. Hemolysis was strongly reduced in a double *dly hlyA* mutant, demonstrating the role of the two pPHDD1-encoded genes in hemolysis. Interestingly, although single *hlyA* and *dly* mutants showed different levels of hemolysis reduction depending on the erythrocyte source, hemolysis was not abolished in any of the single mutants, suggesting that the hemolytic phenotype is the result of the additive effect of Dly and HlyA. We found that pPHDD1-encoded *dly* and *hlyA* genes are necessary for full virulence for mice and fish. Our results suggest that pPHDD1 can be considered as a driving force for the emergence of a highly hemolytic lineage of *P. damsela* subsp. *damsela*.

*Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (formerly *Vibrio damsela*) is a halophilic bacterium associated with marine environments that was initially isolated in 1981 as the causative agent of skin ulcers in damselfish (34). It is a primary pathogen causing ulcers and hemorrhagic septicemia in a variety of marine species as sharks, dolphins, and shrimps, as well as wild and cultivated fish (18, 20, 45). In addition, this pathogen can cause fatal infections in humans. Most of the reported infections in humans have their origin in wounds inflicted during the handling of fish, exposure to seawater and marine animals, and ingestion of raw seafood (1, 2, 26, 38, 53). In some of the human cases the infection progresses into an extreme variant of a highly severe necrotizing fasciitis that advances following a very aggressive course leading to a fatal outcome (7, 53).

*P. damsela* subsp. *damsela* shares species level status with *P. damsela* subsp. *piscicida* (formerly *Pasteurella piscicida*), the causative agent of fish pasteurellosis (21). Although subsp. *damsela* is pathogenic for marine animals and humans, subsp. *piscicida* is only pathogenic for fish, it does not grow at 37°C and lacks observable hemolytic activity on blood agar plates (36, 41, 42). Very little is known about the virulence factors that enable *P. damsela* subsp. *damsela* to cause septicemia in aquatic animals and humans. A correlation was initially observed between the ability of *P. damsela* subsp. *damsela* to cause disease in mice and to produce large amounts of a cytolytic toxin that was later named damselysin (28) (hereafter referred to as Dly). Partially purified Dly preparations from culture supernatants showed to be active against erythrocytes

of 16 species of homeotherm animals, with rat and mouse being the more sensitive ones (28). Other studies reported that the extracellular products of this bacterium also had hemolytic activity on turbot erythrocytes (16). A deeper characterization of Dly showed that it has phospholipase D activity against sphingomyelin, phosphatidylcholine, and phosphatidylethanolamine (10, 29). The main molecular activity of Dly consists of the removal of the polar choline groups of choline-containing membrane lipids. Dly was found to enhance the hemolytic effect of staphylococcal delta-toxin by removing the polar choline phosphate head group of sphingomyelin (29), which constituted the first evidence that Dly can act synergistically with hemolysins produced by other cells. The Dly toxin gene, *dly*, was cloned (9), and its sequence was determined (GenBank accession no. L16584). However, the genomic context of *dly* gene remained elusive, and the initial observation that highly hemolytic strains yielded spontaneous mutants with markedly reduced hemolytic activity which had lost *dly* gene, along with extensive flanking sequences, suggested that this gene might be located on a mobile element (9).

Thin-layer isoelectric focusing assays showed one major and two minor components with hemolytic activity in *P. damsela* subsp. *damsela* supernatants (27). These observations suggested that other hemolysins in addition to Dly might be produced by this subspecies. The degree of hemolysis varies among *P. damsela* subsp. *damsela* isolates. Two main distinct hemolytic phenotypes could be observed on blood agar plates, with strains showing a large hemolysis halo (LH) and strains producing a small hemolysis halo (SH), although the type strain ATCC 33539 can be described as moderately hemolytic (MH) (7, 9, 16, 30, 42). Early studies demonstrated that the *P. damsela* subsp. *damsela* strains showing the highest values of hemolytic activity were also those more virulent for mice (28). In addition, it was later demonstrated that the strongly hemo-

\* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología e Parasitología, Instituto de Acuicultura, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela 15782, Galicia, Spain. Phone: (34) 881816050. Fax: (34) 881816047. E-mail: cr.osorio@usc.es.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 29 August 2011.

TABLE 1. Strains and plasmids used and constructed in this study

Strain or plasmid	Description <sup>a</sup>	Source or reference
<b>Strains</b>		
<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>		
RM-71	Wild type, isolated from turbot ( <i>Psetta maxima</i> ), strongly hemolytic	18
AR57	RM-71 derivative, spontaneous rifampin-resistant mutant; Rf <sup>r</sup>	This study
AR64	AR57 with in-frame deletion of <i>dly</i> gene	This study
AR133	AR57 with in-frame deletion of <i>hlyA</i> gene	This study
AR78	AR57 with in-frame deletion of <i>dly-hlyA</i> genes	This study
AR61	AR57 with a first cross-over of suicide vector for <i>dly</i> mutant construction; Km <sup>r</sup>	This study
<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>		
PC554.2	Nonhemolytic; Tc <sup>r</sup>	35
AR83	PC554.2 transconjugant that acquired pPHDD1 from AR61 and further selected for suicide plasmid loss	This study
<i>E. coli</i>		
XL1-Blue MR	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}$	Stratagene
DH5- $\alpha$	Cloning strain, <i>recA</i>	Laboratory stock
S17-1 $\lambda$ pir	<i>recA thi pro <math>\Delta</math>hsdR hsdM</i> + RP4-2-Tc:Mu-Km:Tn7 $\lambda$ pir; Tp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup>	Laboratory stock
<b>Plasmids</b>		
pKD4	Template for Km <sup>r</sup> gene	11
pNidKan	Suicide vector, derived from pCVD442; Km <sup>r</sup>	39
pHRP309	<i>lacZ</i> reporter plasmid, mob; Gm <sup>r</sup>	44
pWKS30	Low-copy-number cloning vector; Ap <sup>r</sup>	51
pACYC184	Low-copy-number cloning vector; Tc <sup>r</sup>	Stratagene
pAJR38	pHRP309 with <i>hlyA</i> gene from RM-71	This study
pAJR27	pWKS30 with <i>hlyA</i> gene from RM-71	This study
pAJR29	pACYC184 with <i>dly</i> gene from RM-71	This study

<sup>a</sup> Rf<sup>r</sup>, rifampin resistance; Tc<sup>r</sup>, tetracycline resistance; Gm<sup>r</sup>, gentamicin resistance; Ap<sup>r</sup>, ampicillin resistance; Sm<sup>r</sup>, streptomycin resistance; Km<sup>r</sup>, kanamycin resistance; Tp<sup>r</sup>, trimethoprim resistance.

lytic strains against mouse erythrocytes were also those that hybridized to a *dly* DNA probe (9). Interestingly, both fish and human isolates were represented among the strongly hemolytic and highly virulent strains (28). Actually, previous studies reported that the human isolate CDC2227-81 and the fish isolate RM-71 showed almost identical 50% lethal doses for mice, whereas RM-71 was more virulent for fish than CDC2227-81 (17). Other studies reported that strains lacking *dly* gene still showed virulence for mice and fish, indicating that *dly* is not a prerequisite for virulence in this bacterium (16, 30, 42). In addition, the extracellular products of virulent strains regardless of presence of *dly* gene were lethal for fish and mice, as well as cytotoxic for homeotherm and poikilotherm cell lines (16, 30), suggesting that other virulence factors than *Dly* might play a role in the pathogenesis of this bacterium, but their nature remains unknown.

A significant diversity in plasmid content has been demonstrated in *P. damsela* subsp. *damsela* strains. Some studies reported that highly hemolytic strains harbor a plasmid of ca. 90 to 100 MDa (150 to 170 kb) that is absent in the weakly hemolytic strains (18, 47). Plasmids have been found associated to virulence in *P. damsela* subsp. *piscicida* (13), *V. anguillarum* (12), and *V. nigrilulchritudo* (31), among others.

In the present study we sequenced and characterized pPHDD1, a novel 153-kb plasmid in *P. damsela* subsp. *damsela* strain RM-71 that carries *dly* gene. In addition to *Dly*, pPHDD1 encodes a pore-forming toxin hemolysin of the HlyA family. We provide evidence that *Dly* and HlyA

contribute to the hemolysis and the virulence of *P. damsela* subsp. *damsela*.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids, and culture conditions.** The bacterial strains used here and those derived from the present study are listed in Tables 1 and 2. The plasmids are listed in Table 1. *P. damsela* subsp. *damsela* strains were subjected to standard biochemical tests to corroborate their taxonomic position and PCR tested for subspecies-specific gene markers (43). *P. damsela* subsp. *damsela* cells were routinely grown at 25°C on tryptic soy agar supplemented with 1% NaCl (TSA-1) or tryptic soy broth supplemented with 1% NaCl (TSB-1). Sheep blood agar plates (Oxoid) were used for conjugative matings and hemolysis assays. Human, rat, and turbot blood was aseptically collected and added to TSA-1 at a final concentration of 5% (vol/vol) to obtain human, rat, and turbot blood agar, respectively. For hemolysis assays on agar plates, a single colony of each strain grown on a TSA-1 plate was picked with the tip of a rounded wooden pick and seeded on the blood agar plate, and pictures were taken after 15 h of incubation at either 25 or 37°C. *Escherichia coli* strains were routinely grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) broth and LB agar, supplemented with antibiotics when appropriate. Antibiotics were used at the following final concentrations: kanamycin at 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, ampicillin sodium salt at 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, tetracycline at 4  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, gentamicin at 15  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, and rifampin at 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>.

**Cosmid library construction, DNA sequencing, and annotation.** Genomic DNA of *P. damsela* subsp. *damsela* RM-71 was purified using a genome DNA kit (Qbiogene). DNA was partially digested with Sau3AI and ligated into the compatible BamHI site of alkaline phosphatase-treated SuperCos 1 cosmid vector (Stratagene). The ligated products were packaged into bacteriophage lambda particles using an *in vitro* packaging kit (Gigapack III Gold packaging extract; Stratagene) and introduced into *E. coli* XL1-Blue MR cells. The nucleotide sequences of cosmid DNA were determined using a 454 GS-FLX platform (Roche) and assembled using Newbler software (Roche). Sequences were further analyzed with the online BLAST facility of the National Center for Bio-

TABLE 2. PCR detection of pPHDD1 gene markers within the *P. damsela* subsp. *damsela* strain collection<sup>a</sup>

<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> strain	Source	Presence (+) or absence (–) of various pPHDD1 markers									Hemolytic halo <sup>b</sup>
		<i>dly</i>	<i>hlyA</i>	<i>parA</i>	<i>orf2</i>	<i>repA</i>	<i>vep07</i>	<i>tolC</i>	<i>tadC</i>	<i>rcpA</i>	
RM-71	Turbot, Spain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	LH
RG-91	Turbot, Spain	+	+	+	–	–	+	+	+	+	LH
RG-153	Turbot, Spain	+	+	+	–	–	+	+	+	+	LH
RG-214	Turbot, Spain	+	+	+	–	–	+	+	+	+	LH
CDC2227-81	Human, United States	+	+	+	–	–	+	+	+	+	LH
ATCC 33539	Damselfish, United States	+	+	+	–	–	+	+	+	+	MH
LD-07	Seabream, Spain	–	–	–	–	–	–	–	–	–	SH
340	Seawater, Spain	–	–	–	–	–	–	–	–	–	SH
309	Mussel, Spain	–	–	–	–	–	–	–	–	–	SH
158	Eel, Belgium	–	–	–	–	–	–	–	–	–	SH
162	Eel, Belgium	–	–	–	–	–	–	–	–	–	SH
PG801	Shrimp, Taiwan	–	–	–	–	–	–	–	–	–	SH
192	Dolphin, United States	–	–	–	–	–	–	–	–	–	SH
238	Dolphin, United States	–	–	–	–	–	–	–	–	–	SH
ATCC 35083	Brown shark, United States	–	–	–	–	–	–	–	–	–	SH
J3G801	Shrimp, Taiwan	–	–	–	–	–	–	–	–	–	NH
PC586.1	Seabream, Spain	–	–	–	–	–	–	–	–	–	SH

<sup>a</sup> *orf2* and *repA* are gene markers of the two RM-71-specific insertions A and B, respectively.

<sup>b</sup> LH, large hemolytic halo; MH, medium hemolytic halo; SH, small hemolytic halo; NH, no hemolytic halo.

technology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Annotation of plasmid was carried out with the RAST server (3), and a plasmid graphical map was generated with the CGView Server (22). G+C content analyses were conducted using the Artemis comparison tool (6). Protein domains were searched using the Pfam database (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). The nucleotide sequence of pPHDD1 determined in the present study was deposited in GenBank under accession number NC\_014653.

**Plasmid DNA.** Plasmid DNA was extracted from *P. damsela* subsp. *damsela* following a modification of a previously described method (54). Cells were harvested from a 1-ml overnight culture in tryptic soy broth. Pelleted cells were resuspended in 300  $\mu$ l of TENS solution (0.09 N NaOH and 0.45% sodium dodecyl sulfate in Tris-EDTA buffer) plus 170  $\mu$ l of 3 M sodium acetate (pH 5.2). This mixture was incubated on ice and centrifuged. Plasmid DNA in the supernatant was extracted twice with an equal volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1), precipitated with ethanol, and resuspended in ca. 20 to 40  $\mu$ l of Tris-EDTA buffer with RNase (20  $\mu$ g/ml). DNA samples mixed with loading buffer were electrophoresed through 0.7% agarose gels (type II; Sigma). Plasmid molecular sizes were estimated using the reference plasmids from *E. coli* 39R861 (plasmids of 154, 66.2, 37.6, and 7.4 kb) (48).

**Mapping of pPHDD1 replication origin.** A pPHDD1 2,698-bp region (positions 94549 to 97247 in the annotated sequence) containing *repB* gene (open reading frame 105 [ORF105]) and the putative iteron sequences was PCR amplified with oligonucleotides containing BamHI sites and ligated to the BamHI-cut PCR-amplified kanamycin resistance gene from plasmid pKD4 (11). The ligation reaction was electroporated into *E. coli* DH5- $\alpha$  cells, and kanamycin-resistant colonies were selected. The plasmid DNA from a kanamycin-resistant colony was purified and subjected to DNA sequencing.

**Conjugation.** Conjugations were performed by agar plate matings. Exponential growing cells of donor and recipient strains were mixed, a drop (100  $\mu$ l) placed directly onto a sheep blood agar plate, followed by incubation at 25°C for 3 days. Cells were scraped off the plate and resuspended in TSB-1, and 100- $\mu$ l aliquots of serial decimal dilutions were spread onto TSA-1 plates with the corresponding antibiotic combinations to select for donors and transconjugants. The frequency of conjugal transfer, when necessary, was calculated as the number of transconjugants per donor cell.

**Mutant construction and gene complementation.** Single and double nonpolar deletions were constructed by using PCR amplification of the amino- and carboxy-terminal fragments of each gene which, when fused together, would result in an in-frame deletion. Amplification was carried out using Hi-Fidelity Kapa Taq (Kapa). Allelic exchange was performed as previously described using the Km<sup>r</sup> suicide vector pNidKan, containing *sacB* gene conferring sucrose sensitivity and R6K *ori* requiring the *pir* gene product for replication (39). The plasmid constructions containing the deleted alleles were mated from *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir into a rifampin-resistant derivative (AR57) of *P. damsela* subsp. *damsela* RM-71, selecting for kanamycin resistance for plasmid integration and subsequently for sucrose resistance (15% [wt/vol]) for a second recombination event. This led

to the obtention of *P. damsela* subsp. *damsela* *dly*, *hlyA*, and double *dly hlyA* mutant strains (Table 1). The presence of the correct alleles was confirmed by PCR. For complementation, *dly* and *hlyA* ORFs, together with their respective promoter sequences, were PCR amplified with Hi-Fidelity Kapa Taq, cloned into pHRP309 vector and mobilized from *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir into the respective *P. damsela* subsp. *damsela* *dly* and *hlyA* mutants, as well as into *P. damsela* subsp. *damsela* ATCC 33539.

**Curation of pPHDD1.** Curation of pPHDD1 was attempted by using RM-71 derivative strains containing a first crossover of the suicide vector constructions used for generation of the *hlyA* and the *dly* mutants (Table 1). This approach takes advantage of the inability of the suicide vector pNidKan to replicate in *P. damsela* subsp. *damsela* and of its positive (Km<sup>r</sup>) and negative (sucrose sensitivity) selectable properties. After several passages on LB without selection, the first crossover strains were grown on LB agar with 15% sucrose, and colonies were tested for kanamycin sensitivity. Colonies that had lost the suicide plasmid were further tested on sheep blood agar plates for hemolysis reduction, as well as for lack of pPHDD1 markers by PCR, until pPHDD1-negative clones were found. As explained below, curation of pPHDD1 was a very rare event that could only be achieved from first crossover strains that had undergone additional mutations or DNA sequence loss that altered the hemolytic phenotype and rendered the strain unable to grow at 37°C.

**Mice and fish virulence assays.** Virulence assays were carried on with BALB/c mice (6 to 8 weeks old, 26 to 30 g), as well as with turbot (*Psetta maxima*) (average weight, 15 g), in groups of five animals. The inoculum was prepared by suspending several colonies from a 24-h TSA-1 culture into saline solution to achieve the turbidity of a no. 2 McFarland standard. Mice were inoculated at the tail vein with 50  $\mu$ l of a 2.5  $\mu$ M hemoglobin solution (8  $\mu$ g hemoglobin per mouse) 2 h before inoculation with the bacterial suspension, as previously described (19). Mice were inoculated intravenously at the tail vein, and turbot were inoculated intraperitoneally, with 0.1 ml of 10-fold serial dilutions of the bacterial suspensions and the actual number of injected CFU was determined by plate count on TSA-1. The final doses assayed corresponded to  $2.1 \times 10^6$  and  $2.1 \times 10^5$  bacterial cells per mice and  $2.1 \times 10^4$  and  $2.1 \times 10^3$  bacterial cells per fish. The mortalities were recorded daily for 3 days (mice) and 4 days (turbot), and the degree of virulence was expressed as percent values.

## RESULTS

**Diversity of hemolytic phenotypes in *P. damsela* subsp. *damsela* isolates and correlation with *dly* gene presence.** We conducted a hemolysis screening on sheep blood agar for a collection of 17 *P. damsela* subsp. *damsela* strains from different origins (Table 2), and four distinct phenotypes were found. Among the 17 strains, 6 showed a large hemolysis halo



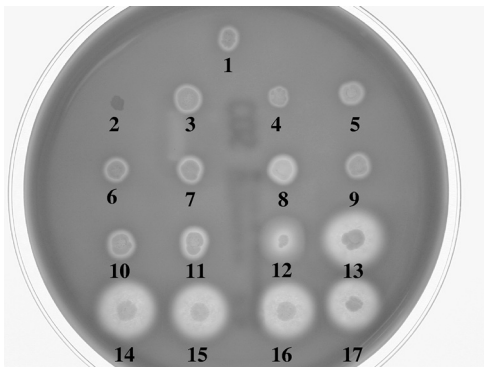


FIG. 1. Hemolytic phenotypes of *P. damsela* subsp. *damsela* strains on sheep blood agar. Strains (spot number, strain): 1, PC586.1; 2, J3G801; 3, ATCC 35083; 4, 238; 5, 192; 6, PG801; 7, 162; 8, 158; 9, 309; 10, 340; 11, LD-07; 12, ATCC 33539; 13, CDC2227-81; 14, RM-71; 15, RG-214; 16, RG-153; 17, RG-91. Four distinct phenotypes are recognized: large hemolysis (LH) (strains at spots 13 to 17), moderate hemolysis (MH) (strain 12), small hemolysis (SH) (strains at spot 1 and spots 3 to 11) and no hemolysis (NH) (strain at spot 2). The strains at spots 12 to 17 are positive for pPHDD1 markers.

(LH), one was nonhemolytic (NH), one showed moderate hemolysis (MH), and the remaining 9 strains yielded a small hemolytic halo (SH) on sheep blood agar plates (Fig. 1 and Table 2). In order to assess the correlation between *dly* gene presence and hemolytic phenotype, we PCR tested the strain collection using specific primers for *dly* gene (42). We found that the strains positive for *dly* (strains 12 to 17) ((Fig. 1 and

Table 2) showed a hemolytic halo whose radius was ca. 5 to 10 times larger than that produced by the *dly*-negative strains (Fig. 1). In light of these results, the presence of *dly* is linked to the ability of *P. damsela* subsp. *damsela* to cause a large hemolytic halo on blood agar plates (Fig. 1 and Table 2), whereas the small hemolytic halo is characteristic of strains that lack *dly*.

**Damselysin is encoded on a large plasmid in *P. damsela* subsp. *damsela* RM-71.** In order to characterize the genetic context of *dly*, we constructed a cosmid library of the highly hemolytic strain RM-71. This strain was selected because of its strong hemolytic phenotype and because it was reported to be as virulent for mice as the clinical strain CDC2227-81 and more virulent for fish (17). A total of 316 clones were streaked on sheep blood agar and two beta-hemolytic cosmids that tested positive by PCR for *dly* gene were identified. We found five overlapping cosmids whose 5' and 3' end sequences tested negative by PCR in *dly*-negative strains and accounted for a circular structure. The five cosmids were subjected to 454 DNA sequencing, yielding a 153,429-bp circular molecule that constituted a novel *P. damsela* subsp. *damsela* plasmid which was dubbed pPHDD1 and that contains *dly* gene (Fig. 2). In order to have physical evidence of pPHDD1, plasmid DNA was isolated from three *dly*-positive strains (RM-71, ATCC 33539, and RG-91) and from one *dly*-negative isolate (PG801). An ~150-kb plasmid band (100 MDa) was evident in agarose gels in the three *dly*-positive strains but not in the *dly*-negative strain (data not shown).

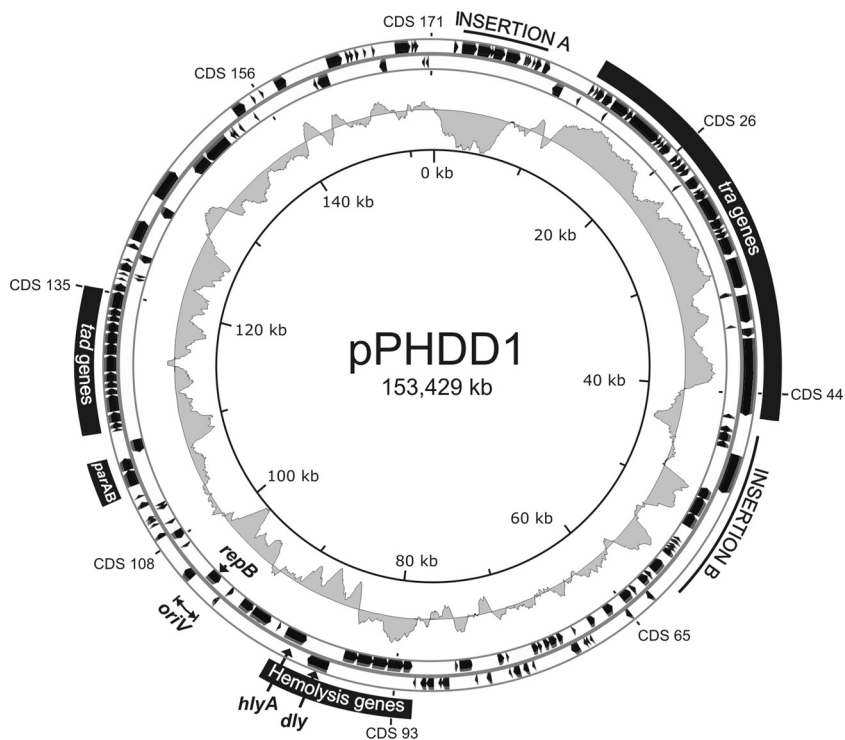


FIG. 2. Circular representation of the *P. damsela* subsp. *damsela* pPHDD1 plasmid. The first circle (i.e., the outermost) represents pPHDD1 ORFs (in black, two rows of arrows corresponding to each of the two DNA strands, respectively), and specific genes, replication origin (*oriV*) as well as functional modules and insertions are highlighted. The next circle (moving inward) shows the G+C percent variation. The innermost circle shows the nucleotide positions in 20-kb intervals.



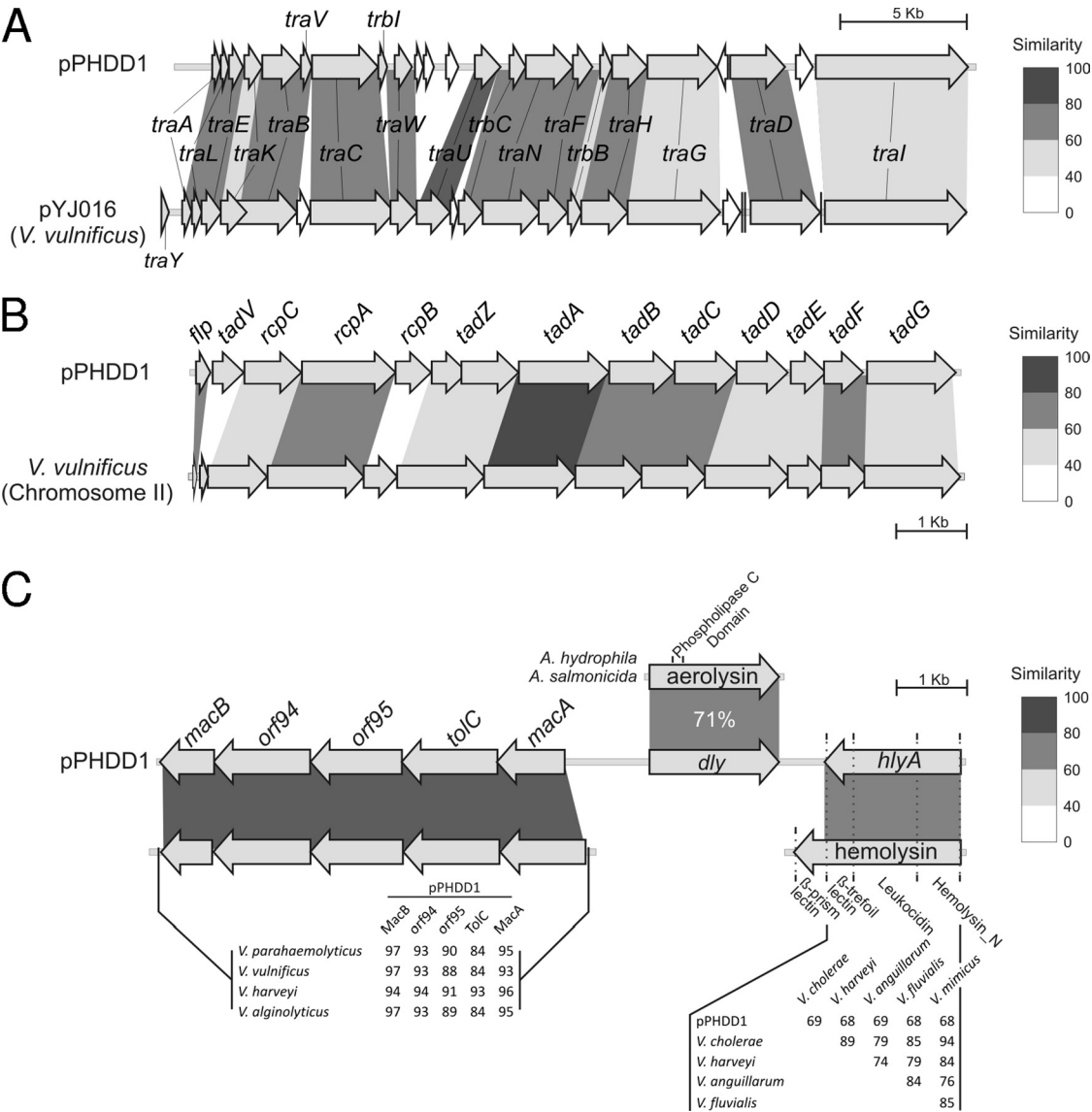


FIG. 3. Physical maps of *tra* (A), *tad* (B), and hemolysin (C) clusters of *P. damsela* subsp. *damsela* pPHDD1 plasmid compared to related genes in other species of marine bacteria. pPHDD1 *tra* genes without counterpart in the species being compared are filled in white. The percent similarity refers to the amino acid sequences of the predicted proteins and is represented in similarity intervals in grayscale tones according to the scale depicted at the right of the figures. In panel C, similarity percent values between pairs of species are shown either in the shaded region (for *Dly*) or in data matrices.

**Genetic structure of pPHDD1.** The complete sequence of pPHDD1 consists of 153,429 bp and encodes 172 predicted ORFs (Fig. 2). The average G+C content was 37.9%, which is comparable to the G+C content of the *P. damsela* subsp. *damsela* reference strain genome (40%). The G+C content distribution is heterogeneous along the plasmid (Fig. 2), varying from 62.5 to 11.6% using a 120-bp window. Five modules can be highlighted in pPHDD1: a replication module, a partitioning module, a conjugation machinery module, a *tad* (tight adherence) module, and a hemolysin module (Fig. 2).

The nucleotide sequence upstream and downstream of the *repB* gene shows a high A+T value, and downstream of the *repB* there are three directed tandem repeats of the 9-mer TAAGATCTA that might correspond to iterons. These data

suggest that the region surrounding *repB* might contain the pPHDD1 replication origin. In support of this, we found that a PCR-amplified 2.6-kb region that included *repB*, and the putative iteron sequences ligated to a kanamycin resistance gene was capable of independent replication into *E. coli* DH5- $\alpha$  (data not shown). The putative partitioning module (*parA* and *parB* genes) bears similarity to the *par* genes of *Enterobacteriaceae* plasmids. No evident addiction system genes, such as toxin/antitoxin genes, were found in pPHDD1 sequence by homology search.

pPHDD1 contains a set of *tra* genes encoding homologues of proteins of type IV secretion systems described in plasmids of other marine bacteria (Fig. 3A), suggesting that pPHDD1 might be conjugative. In this regard, we were able to detect

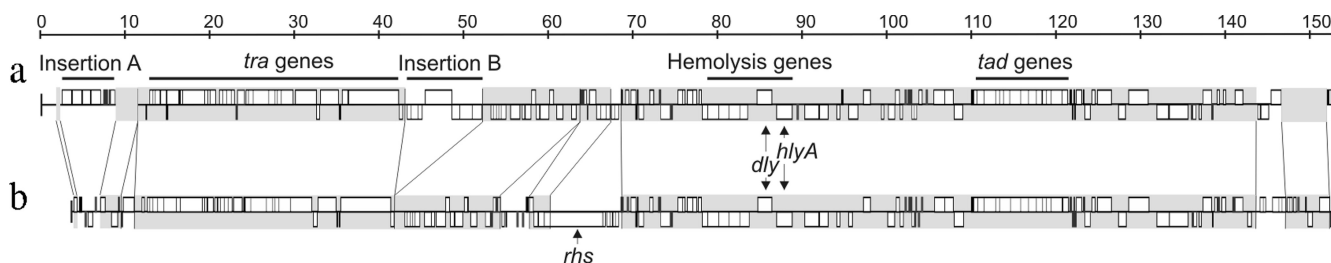


FIG. 4. Conservation of synteny between *P. damsela* subsp. *damsela* RM-71 pPHDD1 plasmid (a) and contig 55 from *P. damsela* subsp. *damsela* ATCC 33539 (GenBank accession no. NZ\_ADBS01000004) (b). Conserved blocks of synteny between the two sequences are indicated in gray. Vertical and diagonal lines connect regions of synteny that are separated by insertions specific to one of the two molecules. Two main pPHDD1 insertions (insertions A and B), functional modules (*tra*, *tad*, and hemolysis clusters), and gene names (*rhs*, *dly*, and *hlyA*) are highlighted.

conjugative transfer of a marked version of this plasmid to *P. damsela* subsp. *piscicida* although at a very low frequency (see below). pPHDD1 also contains a complete set of *tad* (tight adherence) genes that likely encode the biogenesis of the Flp subfamily of pili and show synteny with *tad* clusters of *Vibrio* species (Fig. 3B). These pili, initially described in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as mediators of a tight-adherence phenotype, are involved in adhesion to abiotic surfaces and host cell attachment (49).

One of the most notable aspects of pPHDD1 is the presence of a hemolysin cluster that contains five genes of a putative secretion system, as well as two hemolysin genes that encode the previously characterized Dly toxin and a hitherto uncharacterized pore-forming toxin HlyA, respectively (Fig. 3C). Although the activity of Dly was known for the past 2 decades, the complete sequence of *dly* gene remained unpublished until now. We found that the amino acid sequence of Dly bears little homology to known proteins and shows no conserved domains other than a putative phospholipase C domain. Only two homologues of Dly exist in databases: the phospholipase C aerolysins of *Aeromonas hydrophila* (37) and *A. salmonicida* (24), respectively (Fig. 3C). The gene for HlyA lies downstream of *dly* and is transcribed from the opposite strand. HlyA has similarity with HlyA pore-forming toxins with hemolytic activity described in *Vibrio* species, with similarity values ranging from 68 to 69% (Fig. 3C). HlyA hemolysins are predicted to form heptameric pore structures into the erythrocyte membrane, altering its permeability (23). A Pfam database search predicted in *P. damsela* subsp. *damsela* HlyA three conserved domains that are shared with HlyA of *Vibrio cholerae* (23, 40, 52) and other *Vibrio* species, albeit some *Vibrio* HlyAs contain an additional fourth domain at their C terminus that is absent in *P. damsela* (Fig. 3C).

The five genes upstream *dly* encode a putative secretion system that might be involved in the secretion of the two hemolysins. This system includes an inner membrane ATPase component homologous to *macB* (32), two ATP-binding/permease components, a membrane fusion protein, and TolC, respectively. In *E. coli*, TolC is specifically required for HlyA secretion (50). Interestingly, highly conserved homologues of these five proteins are found in several *Vibrio* genomes (Fig. 3C). It is noteworthy that these homologues have chromosomal locations in the *Vibrio* species and are not closely linked to Dly and HlyA homologues (data not shown).

**Distribution and variability of pPHDD1 among *P. damsela* subsp. *damsela* isolates.** While the present study was under way, the genome sequence of the *P. damsela* subsp. *damsela* type strain ATCC 33539 was made available in public databases under several separate contigs (GenBank accession number ADBS000000000). One contig (contig 55) of 149,928 bp showed a high degree of synteny with the pPHDD1 sequence that we report here (strain RM-71). However, we found some differences between these two sequences, pPHDD1 being 3,501 bp larger (Fig. 4). Contig 55 harbors an *rhs* gene that is absent from pPHDD1, and two DNA regions of pPHDD1 are absent from the ATCC 33539 contig 55. These two DNA regions were dubbed insertion A (6.6 kb) and insertion B (11 kb), respectively (Fig. 2 and 4). Insertion A has a G+C content lower than the average of the plasmid and comprises 10 truncated ORFs that constitute pseudogenes. Insertion B comprises 11 predicted ORFs, two of them encoding distinct phage integrases with low homology to *Shewanella* integrases. Interestingly, we found that insertion B is unstable since a spontaneous deletion of a large part of it was observed in a transconjugant *P. damsela* subsp. *piscicida* clone that received pPHDD1 by conjugative transfer (see below). To get an insight into the molecular mechanism underlying this loss of DNA sequences, the region involved in the excision was PCR amplified and sequenced. We found that the excised region corresponded to a 9,202-bp sequence flanked by a perfect 12-bp DNA direct repeat (CGTGGGGTGTCA). It is tempting to speculate that this direct repeat might be the target of one of the integrases encoded by *orf51* and *orf52*.

In order to get an insight into the genetic diversity among pPHDD1-like plasmids, we conducted a PCR screening of seven interspersed pPHDD1 gene markers—*dly*, *hlyA*, *parA*, *vep07*, *tolC*, and the two *Tad* genes *rcpA* and *tadC*—in the collection of *P. damsela* subsp. *damsela* strains. Of the 17 strains tested, 6 gave a positive result for the seven markers, whereas the remaining 11 strains tested negative (Table 2). These results suggest the genetic linkage between the assayed genes and show the existence of differential distribution of pPHDD1-like plasmids among strains of this pathogen. Moreover, the three strains in which physical presence of pPHDD1 was demonstrated by gel electrophoresis (see above) tested positive for the markers, whereas PG801 strain tested negative, confirming the direct relationship between the presence of the ~150-kb plasmid band and pPHDD1 markers. As expected,

we found a correlation between presence of pPHDD1 markers and the production of a large or moderate hemolytic halo in the strains that had previously tested positive for the *dly* gene by PCR (strains 12 to 17) (Fig. 1, Table 2). When we PCR tested two pPHDD1 genes (*repA* and *orf2*) that are part of the two DNA insertions A and B, respectively, all of the strains except RM-71 yielded a negative result (Table 2), indicating that insertions A and B are unique to strain RM-71.

**pPHDD1 confers hemolytic activity to *P. damsela* subsp. *piscicida* upon conjugative transfer.** Further evidence of the pPHDD1 involvement in the hemolysis activity of *P. damsela* could be gained by attempting to transfer pPHDD1 by conjugation into a strain of the nonhemolytic subspecies *P. damsela* subsp. *piscicida* and analyzing the phenotypic changes in the recipient. As described above, pPHDD1 encodes a set of *tra* genes, suggesting that this plasmid is conjugative. We mated the kanamycin-labeled *P. damsela* subsp. *damsela* AR61 (Table 1) as a donor and the tetracycline-resistant *P. damsela* subsp. *piscicida* PC554.2 as a recipient. As a result, tetracycline/kanamycin-resistant *P. damsela* subsp. *piscicida* transconjugants were isolated at a low frequency of  $\sim 10^{-8}$ . These transconjugants showed a reduced hemolysis due to the fact that they contained the insertion of the suicide plasmid within the *hlyA* gene. We therefore selected for suicide plasmid loss on sucrose plates and searched for clones that had lost the suicide vector but that restored the wild-type gene. Doing this, we isolated the kanamycin-sensitive *P. damsela* subsp. *piscicida* AR83. This strain tested positive by PCR for eight pPHDD1 gene markers, as well as for several subsp. *piscicida*-specific gene markers (data not shown). This indicates that pPHDD1 is an independent replicon capable of undergoing conjugative transfer. We found that AR83 produced hemolysis on sheep blood agar plates (Fig. 5), although the halo was ca. 63% of that produced by subsp. *damsela* parental strain AR57 (rifampin-resistant derivative of RM-71). The hemolysis caused by AR83 on human and rat blood agar plates was very weak compared to AR57, suggesting that either additional factors non-pPHDD1 encoded are involved in the production of the strong hemolytic phenotype showed by AR57 or that the expression of the hemolytic determinants in subsp. *piscicida* cells does not achieve the optimal conditions.

**HlyA and Dly contribute to hemolysis in *P. damsela* subsp. *damsela*.** To date, the hemolytic activity of *P. damsela* subsp. *damsela* has been explained exclusively on the basis of *dly* gene, having been reported a direct relationship between highly hemolytic *P. damsela* subsp. *damsela* strains and the presence of the *dly* gene (9). However, our finding of an HlyA family hemolysin gene in pPHDD1 plasmid raises the question whether Dly is the only responsible of hemolysis or whether HlyA also plays a role. Based on previously described homologues in vibrios, the *P. damsela* subsp. *damsela* HlyA is predicted to be a protein with hemolytic activity. In order to unravel the contribution of Dly and HlyA, we analyzed single *dly* (AR64), single *hlyA* (AR133), and double *dly hlyA* (AR78) knockout mutants.

Since *P. damsela* subsp. *damsela* is a marine bacterium that causes disease in marine animals but is also known to cause opportunistic disease and death in humans, we evaluated the hemolytic phenotype on homeotherm (sheep, human, and rat) and poikilotherm (turbot) blood sources. Hemolysis was as-

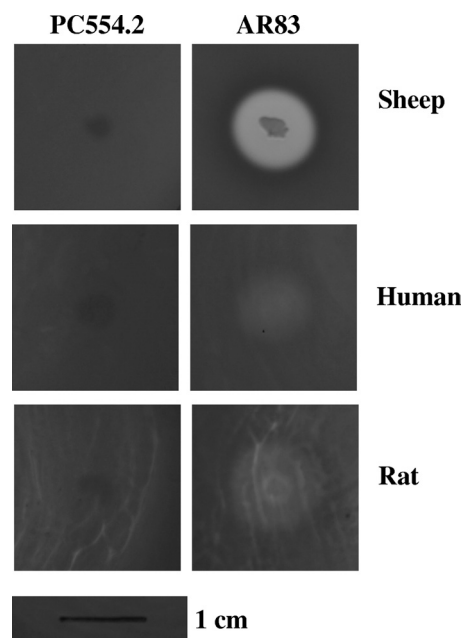


FIG. 5. Hemolytic activity in sheep, human, and rat blood agar plates of *P. damsela* subsp. *piscicida* PC554.2 and AR83 (the transconjugant that acquired pPHDD1 after conjugative transfer). Scale bar, 1 cm.

sayed at 25°C for the four blood types (Fig. 6A) and also at 37°C in two homeotherm blood types (Fig. 6B). We observed that each erythrocyte source had a different susceptibility to be hemolyzed by the parental strain. Turbot and rat erythrocytes, followed by sheep blood, showed the largest hemolysis halos at 25°C after 15 h, whereas human blood showed low susceptibility. Interestingly, when the assays were carried out at 37°C, a larger but less translucent halo was observed, and this halo disappeared in the *dly* mutants, which suggested that it is due to Dly (Fig. 6B).

Although different results were observed with the *dly* mutant depending on the erythrocyte source, we found that mutation of *dly* did not completely abolish hemolysis in any of the four erythrocyte sources. This indicates that Dly is not the only cause of the hemolytic phenotype in pPHDD1-harboring strains, although it clearly contributes to the production of a phenotype of large hemolytic halo (LH). We therefore wanted to test the contribution of *hlyA* to hemolysis. Interestingly, mutation of *hlyA* caused only a slight reduction in the radius of the hemolysis halo on the four blood sources assayed. Based on these results we can propose that hemolysis in *P. damsela* subsp. *damsela* is mainly due to the sum of the contributions of Dly and HlyA. In order to demonstrate this hypothesis, we assayed the effect of the deletion of the two hemolysis genes. As expected, the *hlyA dly* double mutant (AR78) showed a >80% reduction in the hemolytic halo on sheep, rat, human, and turbot blood, which decreased to levels similar to those observed for the pPHDD1-negative strains on sheep erythrocytes (Fig. 6; see also Fig. 1). These results suggest the existence of an additive effect between Dly and HlyA to produce hemolysis and also suggest that Dly is a major contributor to hemolysis on rat, human, and turbot erythrocytes.

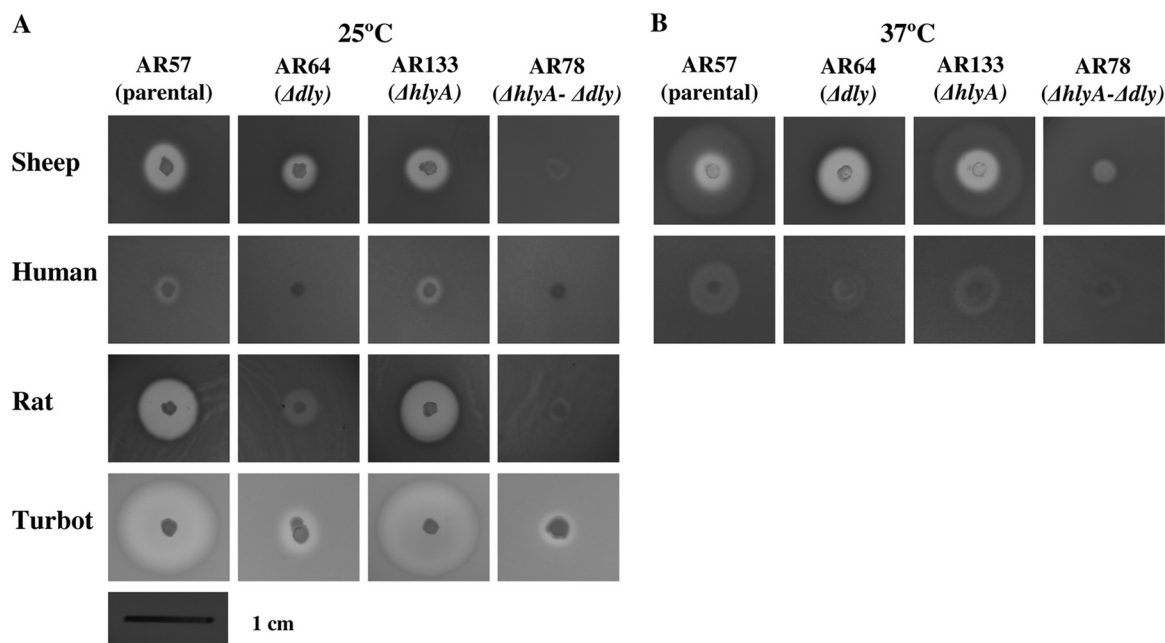


FIG. 6. Hemolytic activity in sheep, human, rat, and turbot blood agar plates of *P. damsela* subsp. *damsela* parental strain and mutants at 25°C (A) and 37°C (B). Strains: AR57 (parental strain), AR64 ( $\Delta dly$ ), AR133 ( $\Delta hlyA$ ), AR78 ( $\Delta dly \Delta hlyA$  double mutant). Pictures were taken after 15 h of growth. Scale bar, 1 cm.

In order to gain additional information on the contribution of *Dly* and *HlyA* to the hemolytic phenotype and to assess whether the two hemolysins show a synergistic as well as an additive effect, we assayed the hemolytic phenotype conferred by each individual gene and by the two genes together to *E. coli* DH5- $\alpha$ . Interestingly, *E. coli* cells harboring either *hlyA* or *dly* gene showed small hemolytic halos on sheep blood agar plates (Fig. 7A), the halo of the *hlyA* gene being more translucent than that conferred by *dly*. Interestingly, when the two genes were introduced into *E. coli*, the hemolytic halo produced was

significantly larger than the mere addition of the two individual halos (Fig. 7A). This result suggests the existence of a synergistic effect between the two hemolysins.

It is interesting that the type strain ATCC 33539 is positive for pPHDD1 markers, while it only shows moderate hemolysis (MH) on sheep blood agar, whereas all of the other pPHDD1-positive strains show a large hemolysis (LH) halo (Fig. 1). We compared the nucleotide sequences of *hlyA* genes between RM-71 and ATCC 33539 and found a number of amino acid substitutions (data not shown). Hence, we hypothesized that ATCC 33539 might produce a protein with reduced hemolytic activity. We therefore conjugally transferred into ATCC 33539 a plasmid (pAJR38) containing the cloned *hlyA* gene from RM-71 and found a restoration of the hemolytic phenotype at levels similar to those of RM-71 (Fig. 7B). This observation suggests that the moderate hemolytic halo of the type strain could be in part due to substitutions in the ATCC 33539 *HlyA* sequence with respect to RM-71 *HlyA*.

We tried to cure pPHDD1 from AR57 derivatives containing the first crossover insertions of the suicide plasmids used to obtain the *dly* and *hlyA* mutants (see Materials and Methods), but all of the attempts were unsuccessful. We finally obtained to some extent a first crossover insertion for the *hlyA* mutant construction that, when selecting for loss of the complete pPHDD1-suicide plasmid cointegrate, yielded cured colonies at a very high frequency (data not shown). However, we noted that this first crossover insertion was unable to grow at 37°C and showed a considerable reduction in the hemolytic activity that could not be restored by complementation with *dly* and *hlyA* (data not shown). Thus, curation of pPHDD1 could only be selected under circumstances that likely involved the loss of other genomic sequences or the occurrence of spontaneous mutations elsewhere on the genome.

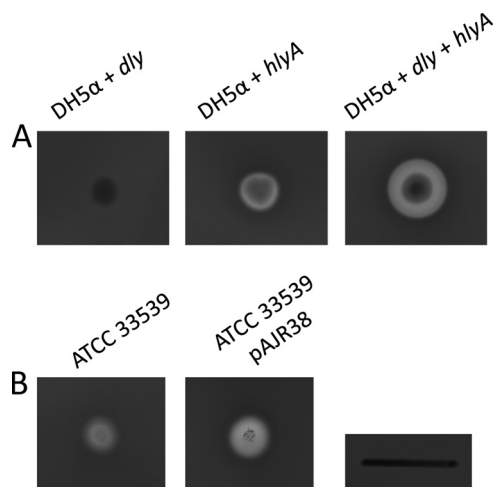


FIG. 7. (A) Complementation of *E. coli* DH5- $\alpha$  with *dly* and *hlyA* genes of strain RM-71, cloned in plasmids pAJR29 and pAJR27. (B) Complementation of *P. damsela* subsp. *damsela* ATCC 33539 with the *hlyA* gene of strain RM-71, cloned in plasmid pAJR38. Scale bar, 1 cm.



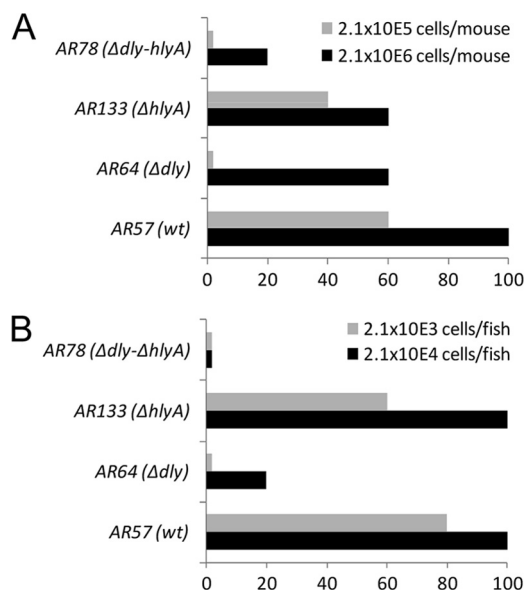


FIG. 8. Mouse (A) and fish (B) virulence assays with *P. damsela* subsp. *damsela* strains, using two different doses. The results are expressed as the percent mortality.

**Contribution of *dly* and *hlyA* to *P. damsela* subsp. *damsela* virulence for mice and fish.** Dly has been recognized as a cytolytic toxin with lethal activity for mice. We assayed the roles of *dly* and *hlyA* on the ability of *P. damsela* subsp. *damsela* to cause death in mice after tail vein inoculation, using two doses of  $2.1 \times 10^6$  and  $2.1 \times 10^5$  CFU per mouse. Mice died within 12 to 48 h postinfection, and *P. damsela* subsp. *damsela* was recovered from the spleen and liver as pure cultures. The parental strain caused death in 100% of mice inoculated with  $2.1 \times 10^6$  cells and in 60% of mice inoculated with  $2.1 \times 10^5$  cells (Fig. 8A). However, we found that all of the mutants showed some degree of reduction in their virulence. Interestingly, although the single  $\Delta hlyA$  and *dly* mutants still maintained the ability to kill 60% of mice with the high dose, we found that the *dly* mutant was unable to cause death at the lower dose. Since the hemolytic activity results on blood agar suggested the existence of both an additive and synergistic effect between Dly and HlyA, we wanted to test the effect that mutation of the two hemolysin genes had on virulence. We found that the *hlyA dly* double mutant caused the death of only one animal at the high dose, suggesting that a synergistic effect between Dly and HlyA is necessary for maximal virulence in mice.

Since *P. damsela* subsp. *damsela* RM-71 was isolated from diseased turbot, we also assayed the effect of *dly* and *hlyA* mutations on the virulence for fish by intraperitoneal inoculation, using two doses of  $2.1 \times 10^4$  and  $2.1 \times 10^3$  CFU per fish. The fish died within 24 to 72 h postinfection, and *P. damsela* subsp. *damsela* was recovered from the kidney as pure cultures. The parental strain caused death in 100% of fish inoculated with  $2.1 \times 10^4$  cells and in 80% of fish inoculated with  $2.1 \times 10^3$  cells (Fig. 8B). The  $\Delta hlyA$  mutant only showed a slight reduction in virulence at the lower dose but maintained the same virulence values of the parental strain at the high dose. However, the  $\Delta dly$  mutant only killed 20% of fish at the

high dose and no fish at the low dose. No fish deaths were recorded with the *hlyA dly* double mutant. These results suggest not only that Dly and HlyA play a synergistic effect in virulence for fish but also that Dly is the main contributor of the two hemolysins in *P. damsela* subsp. *damsela* virulence for fish. Based on the results obtained with the single and double mutants, it is clear that plasmid pPHDD1 is necessary for maximal virulence in mice and fish infected with *P. damsela* subsp. *damsela*.

## DISCUSSION

Strains of *P. damsela* subsp. *damsela* have been isolated from aquatic environments and as causative agents of disease in a variety of aquatic animals and humans (41). Despite recent reports of fatal human cases due to this bacterium (2, 53), knowledge of the genetic basis of virulence of this bacterium remained quite limited to early studies on Dly toxin. The virulence of *P. damsela* subsp. *damsela* in mice has been previously correlated with the ability to produce Dly (28, 29). Similarly, the symptoms caused by this bacterium in fish have been related to the ability to produce extracellular products, which included phospholipase and hemolysin activities (16). The genomic location of Dly gene remained elusive until now. We found that *dly* is encoded on pPHDD1 in strain RM-71, a novel 153-kb plasmid of *P. damsela* subsp. *damsela*. In accordance with our findings, previous studies reported that all of the strongly hemolytic isolates contained a ca. 150- to 170-kb plasmid, but not the weakly hemolytic ones, with the exception of ATCC 33539 that contained a plasmid but was moderately hemolytic (18, 47). Like many large plasmids, pPHDD1 appears to have a mosaic-like structure due to modular evolution processes in which DNA sequence stretches are acquired by horizontal gene transfer and reorganized by general recombination, transposition, and site-specific recombination (14, 15). In this sense, it is noticeable that different pPHDD1 modules show similarity to plasmid-borne genes from different bacterial taxa. Although the *tra* and *tad* genes bear similarity to *Vibrio* plasmids, the *par* genes are highly similar to the sequences of *Enterobacteriaceae* plasmids.

Tad clusters are involved in the pathogenesis of several bacteria (8, 49). Interestingly, this is the first report of a plasmid-borne Tad cluster in a member of the *Vibrionaceae*, which suggests that conjugative transfer is one of the mechanisms for Tad cluster genes spread in the marine environment. We found that pPHDD1 can be mobilized to *P. damsela* subsp. *piscicida* but at a very low frequency. The reasons for this low transfer rate are unknown. Possible explanations include plasmid incompatibility or entry exclusion mechanisms due to residing plasmids or the necessity for SOS response induction or any environmental stress signal in order to trigger conjugative transfer (4). Although no evident addiction systems were found in pPHDD1 by protein homology searches, curation of this plasmid was only achieved as a rare event that likely involved the occurrence of additional mutations or DNA loss elsewhere in the genome. The reasons for this resistance to curation, as well as the mutations that likely allow pPHDD1 to be lost from cells, are currently unknown.

The existence of two main hemolytic categories among *P. damsela* subsp. *damsela* strains has been largely reported,

with a clear distinction between strongly hemolytic and weakly hemolytic strains on blood agar plates (7, 30, 42). Southern blot analysis revealed that the *dly* gene was found only in highly hemolytic strains (9). In accordance with these previous observations, in the present study we found a direct correlation between pPHDD1 and the *dly* gene and the production of large hemolytic halos on sheep blood agar.

A variety of erythrocyte sources from homeotherms have been reported to be sensitive to *P. damsela* subsp. *damsela* cells and extracellular products (28). In addition, it was known that turbot erythrocytes were sensitive to the extracellular products of *P. damsela* subsp. *damsela* cells (16). To date, hemolysis caused by *P. damsela* subsp. *damsela* was explained exclusively in terms of Dly, although previous studies had suggested the possibility that other hemolysins might be produced (27). Our study has brought into play a hitherto-unknown factor, the pore-forming toxin HlyA. Our experiments with single and double mutants demonstrated that Dly is not only responsible for the strong hemolytic phenotype in *P. damsela* subsp. *damsela*. Rather, we found that both Dly and HlyA contribute to hemolysis. Interestingly, since it can be concluded from the results with the  $\Delta dly$  mutant, Dly makes a differential contribution to hemolysis according to the erythrocyte source, being the major contributor in rats, turbot, and humans. This selectivity might be explained by the different lipid compositions of erythrocyte membranes of each species (25). The lipid composition of mammal erythrocyte membranes is almost identical, with the exception of sphingomyelin being partially replaced equimolarly by phosphatidylcholine in various species and having a direct effect on membrane thermostability (25). That Dly toxin shows phospholipase D activity against sphingomyelin (29) might explain the different degrees of hemolysis observed in the  $\Delta hlyA$  and  $\Delta dly$  mutants depending on the blood source tested. In addition, a possible connection between sphingomyelin content, Dly-mediated hemolysis, and temperature cannot be ruled out. Since sphingomyelin plays a role in membrane thermostability, the removal of sphingomyelin choline head groups by Dly might explain the wider turbid hemolytic halo observed at 37°C in parental and  $\Delta hlyA$  strains (the two producing Dly) with respect to the observed halos at 25°C.

Although the hypothesis of an additive effect between Dly and HlyA might explain most of the hemolytic halos observed in the different mutant combinations and blood sources, there is also evidence that Dly and HlyA may act in a synergistic manner. The experiments carried out in *E. coli* suggest that the effect of the two hemolysins being produced at the same time in the same cell is stronger than the mere addition of their individual contributions. Synergistic effects between hemolysins have been well documented (5, 33, 46). An explanation of how Dly and HlyA interact synergistically can be drawn from the data available for *V. cholerae* cytotoxin VCC. This hemolysin has specificity for cholesterol, which is essential for oligomerization and pore formation (56). It has been proposed that the choline head group of sphingomyelin has an inhibitory effect on VCC pore formation since it shields the cholesterol ring from VCC, constituting the so-called umbrella model (55, 56). This model might be applied to the synergistic effect between Dly and HlyA in *P. damsela* subsp. *damsela*, where

Dly's removal of the choline head group from sphingomyelin would allow HlyA to enhance its hemolytic activity.

The finding that pPHDD1-negative strains produce weak hemolytic halos, together with the observation that the double mutant still produces small halos, clearly suggests the existence of additional hemolysins non-pPHDD1 encoded in *P. damsela* subsp. *damsela* strains. In this regard, previous studies had reported the existence of one major and two minor components with hemolytic activity in *P. damsela* subsp. *damsela* supernatants by thin-layer isoelectric focusing assays (27). An *in silico* analysis of the *P. damsela* subsp. *damsela* ATCC 33539 genome reveals the existence of two genes annotated as encoding putative hemolysin-like proteins (GenBank accession no. ADBS000000000; ORFs VDA\_003208 and VDA\_002420). These putative hemolysins might be responsible for the basal small hemolytic halos observed both in the double mutant and in the pPHDD1-negative strains, and further studies are necessary to ascertain the role of these proteins in hemolysis. Similarly, the observation that a transconjugant *P. damsela* subsp. *piscicida* that received pPHDD1 produced smaller hemolytic halos than did the subsp. *damsela* parental strain might also be partly explained by the existence of non-pPHDD1-encoded hemolysins that contribute to hemolysis.

Our results demonstrate that pPHDD1 is necessary for full virulence of *P. damsela* subsp. *damsela* for mice and fish. The double mutant, lacking pPHDD1-encoded *hlyA* and *dly* genes, caused death in only 20% mice at the high dose and 0% of fish at the two doses assayed, whereas the two single mutants proved to be more virulent than the double mutant. We found that mutation of *hlyA* had less effect on virulence than mutation of *dly* in the two animal models. This observation was consistent with the results obtained in the hemolysis assays, in which the *hlyA* mutant produced larger hemolysis halos than the *dly* mutant. The contribution to virulence of these two genes together was higher than the sum of their individual contributions, which suggests that a synergy between Dly and HlyA toxin is necessary for maximal virulence.

We have found that pPHDD1 is widespread in *P. damsela* subsp. *damsela* strains isolated from diseased marine fish. Thus, strains of this pathogen inhabiting the aquatic environments and infecting poikilotherm animals contain virulence factors that might be of potential concern for human health. Future comparative studies of the genomes of *dly*-positive and plasmidless *P. damsela* subsp. *damsela* strains isolated from mammals and poikilotherms will help to elucidate the key features that allow this marine bacterium to cause disease and explain how pPHDD1 constituted a driving force for the emergence of the highly hemolytic lineage of *P. damsela* subsp. *damsela*.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially supported by grant INCITE08PXIB235028PR from Xunta de Galicia and by grants AGL2009-12266-C02-01 and CSD2007-00002 (Consolider Aquagenomics)—both cofunded by the FEDER Programme from the European Union—from the Ministry of Science and Innovation (MICINN) of Spain. A.J.R. is the recipient of an FPI fellowship from MICINN.

#### REFERENCES

1. Alvarez, J. R., S. Lamba, K. Y. Dyer, and J. J. Apuzzio. 2006. An unusual case of urinary tract infection in a pregnant woman with *Photobacterium damsela*. Infect. Dis. Obstet. Gynecol. 80682:1–3.

2. Asato, J., and F. Kanaya. 2004. Fatal infection of the hand due to *Photobacterium damsela*: a case report. Clin. Infect. Dis. **38**:e100–e101.
3. Aziz, R. K., et al. 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. BMC Genomics **9**:75.
4. Beaber, J. W., B. Hochhut, and M. K. Waldor. 2004. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. Nature **427**:72–74.
5. Bernheimer, A. W., R. Linder, and L. S. Avigad. 1980. Stepwise degradation of membrane sphingomyelin by corynebacterial phospholipases. Infect. Immun. **29**:123–131.
6. Carver, T. J., et al. 2005. ACT: the Artemis comparison tool. Bioinformatics **21**:3422–3423.
7. Clarridge, J. E., and S. Zigelboim-Daum. 1985. Isolation and characterization of two hemolytic phenotypes of *Vibrio damsela* associated with a fatal wound infection. J. Clin. Microbiol. **21**:302–306.
8. Clock, S. A., P. J. Planet, B. A. Perez, and D. H. Figurski. 2008. Outer membrane components of the Tad (tight adherence) secretin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. J. Bacteriol. **190**:980–990.
9. Cutter, D. L., and A. S. Kreger. 1990. Cloning and expression of the damselysin gene from *Vibrio damsela*. Infect. Immun. **58**:266–268.
10. Daniel, L. W., L. King, and M. Kennedy. 1988. Phospholipase activity of bacterial toxins. Methods Enzymol. **165**:298–301.
11. Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **97**:6640–6645.
12. Di Lorenzo, M., et al. 2003. Complete sequence of virulence plasmid pJM1 from the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* strain 775. J. Bacteriol. **185**:5822–5830.
13. do Vale, A., et al. 2005. AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. Mol. Microbiol. **58**:1025–1038.
14. Erauso, G., et al. 2011. Evidence for the role of horizontal transfer in generating pVT1, a large mosaic conjugative plasmid from the clam pathogen, *Vibrio tapetis*. PLoS One **6**:e16759.
15. Fernandez-Lopez, R., et al. 2006. Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. FEMS Microbiol. Rev. **30**:942–966.
16. Fouz, B., J. L. Barja, C. Amaro, C. Rivas, and A. E. Toranzo. 1993. Toxicity of the extracellular products of *Vibrio damsela* isolated from diseased fish. Curr. Microbiol. **27**:341–347.
17. Fouz, B., R. F. Conchas, B. Magariños, and A. E. Toranzo. 1992. *Vibrio damsela* strain virulence for fish and mammals. FHS/AFS Newsl. **20**:3–4.
18. Fouz, B., J. L. Larsen, B. Nielsen, J. L. Barja, and A. E. Toranzo. 1992. Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot *Scophthalmus maximus* in Spain. Dis. Aquat. Org. **12**:155–156.
19. Fouz, B., A. E. Toranzo, E. G. Biosca, R. Mazoy, and C. Amaro. 1994. Role of iron in the pathogenicity of *Vibrio damsela* for fish and mammals. FEMS Microbiol. Lett. **121**:181–188.
20. Fujioka, R. S., S. B. Greco, M. B. Cates, and J. P. Schroeder. 1988. *Vibrio damsela* from wounds in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. Dis. Aquat. Org. **4**:1–8.
21. Gauthier, G., et al. 1995. Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko et al.) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **45**:139–144.
22. Grant, J. R., and P. Stothard. 2008. The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. Nucleic Acids Res. **36**:181–184.
23. He, Y., and R. Olson. 2003. Three-dimensional structure of the detergent-solubilized *Vibrio cholerae* cytotoxin (VCC) heptamer by electron cryomicroscopy. J. Struct. Biol. **169**:6–13.
24. Hirono, I., and T. Aoki. 1993. Cloning and characterization of three hemolysin genes from *Aeromonas salmonicida*. Microb. Pathog. **15**:269–282.
25. Ivanov, I. T. 2007. Allometric dependence of the life span of mammal erythrocytes on thermal stability and sphingomyelin content of plasma membranes. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. **147**:876–884.
26. Kim, H. R., J. W. Kim, M. K. Lee, and J. G. Kim. 2009. Septicemia progressing to fatal hepatic dysfunction in a cirrhotic patient after oral ingestion of *Photobacterium damsela*: a case report. Infection **37**:555–556.
27. Kothary, M. H., and A. S. Kreger. 1985. Purification and characterization of an extracellular cytotoxin produced by *Vibrio damsela*. Infect. Immun. **49**:25–31.
28. Kreger, A. S. 1984. Cytolytic activity and virulence of *Vibrio damsela*. Infect. Immun. **44**:326–331.
29. Kreger, A. S., A. W. Bernheimer, L. A. Etkin, and L. W. Daniel. 1987. Phospholipase D activity of *Vibrio damsela* cytotoxin and its interaction with sheep erythrocytes. Infect. Immun. **55**:3209–3212.
30. Labella, A., et al. 2010. Toxicity of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* strains isolated from new cultured marine fish. Dis. Aquat. Org. **92**:31–40.
31. Le Roux, F., et al. 2011. Virulence of an emerging pathogenic lineage of *Vibrio nigripulchritudo* is dependent on two plasmids. Environ. Microbiol. **13**:296–306.
32. Lin, H. T., et al. 2009. MacB ABC transporter is a dimer whose ATPase activity and macrolide-binding capacity are regulated by the membrane fusion protein MacA. J. Biol. Chem. **284**:1145–1154.
33. Linder, R. 1984. Alteration of mammalian membranes by the cooperative and antagonistic actions of bacterial proteins. Biochim. Biophys. Acta **779**:423–435.
34. Love, M., et al. 1981. *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. Science **214**:1139–1140.
35. Magariños, B., J. L. Romalde, S. Lopez-Romalde, M. A. Morinigo, and A. E. Toranzo. 2003. Pathobiological characterisation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. **23**:183–190.
36. Magariños, B., A. E. Toranzo, and J. L. Romalde. 1996. Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*. Annu. Rev. Fish Dis. **6**:41–64.
37. Merino, S., et al. 1999. Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34. Infect. Immun. **67**:4008–4013.
38. Morris, J. G., Jr., et al. 1982. Illness caused by *Vibrio damsela* and *Vibrio hollisae*. Lancet **i**:1294–1297.
39. Mourão, S., C. R. Osorio, and M. L. Lemos. 2004. Characterization of heme uptake cluster genes in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. J. Bacteriol. **186**:6159–6167.
40. Olson, R., and E. Gouaux. 2003. *Vibrio cholerae* cytotoxin is composed of an alpha-hemolysin-like core. Protein Sci. **12**:379–383.
41. Osorio, C. R., and M. L. Lemos. 2011. *Photobacterium*, p. 959–968. In D. Liu (ed.), Molecular detection of human bacterial pathogens. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
42. Osorio, C. R., J. L. Romalde, J. L. Barja, and A. E. Toranzo. 2000. Presence of phospholipase D (*dly*) gene coding for damselysin production is not a pre-requisite for pathogenicity in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. Microb. Pathog. **28**:119–126.
43. Osorio, C. R., A. E. Toranzo, J. L. Romalde, and J. L. Barja. 2000. Multiplex PCR assay for *ureC* and 16S rRNA genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*. Dis. Aquat. Org. **40**:177–183.
44. Pares, R. E., and C. S. Harwood. 1993. Construction and use of a new broad-host-range *lacZ* transcriptional fusion vector, pHRP309, for gram-bacteria. Gene **133**:23–30.
45. Pedersen, K., I. Dalsgaard, and J. L. Larsen. 1997. *Vibrio damsela* associated with diseased fish in Denmark. Appl. Environ. Microbiol. **63**:3711–3715.
46. Ripio, M. T., C. Geoffroy, G. Dominguez, J. E. Alouf, and J. A. Vazquez-Boland. 1995. The sulfhydryl-activated cytotoxin and a sphingomyelinase C are the major membrane-damaging factors involved in cooperative (CAMP-like) hemolysis of *Listeria* spp. Res. Microbiol. **146**:303–313.
47. Takahashi, H., et al. 2008. Difference of genotypic and phenotypic characteristics and pathogenicity potential of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* between clinical and environmental isolates from Japan. Microb. Pathog. **45**:150–158.
48. Threlfall, E. J., B. Rowe, J. L. Ferguson, and L. R. Ward. 1986. Characterization of plasmids conferring resistance to gentamicin and apramycin in strains of *Salmonella typhimurium* phage type 204c isolated in Britain. J. Hyg. (Lond.) **97**:419–426.
49. Tomich, M., P. J. Planet, and D. H. Figurski. 2007. The *tad* locus: postcards from the widespread colonization island. Nat. Rev. Microbiol. **5**:363–375.
50. Wandersman, C., and P. Delepelaire. 1990. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **87**:4776–4780.
51. Wang, R. F., and S. R. Kushner. 1991. Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. Gene **100**:195–199.
52. Yamamoto, K., A. C. Wright, J. B. Kaper, and J. G. Morris, Jr. 1990. The cytotoxin gene of *Vibrio vulnificus*: sequence and relationship to the *Vibrio cholerae* El Tor hemolysin gene. Infect. Immun. **58**:2706–2709.
53. Yamane, K., et al. 2004. Two cases of fatal necrotizing fasciitis caused by *Photobacterium damsela* in Japan. J. Clin. Microbiol. **42**:1370–1372.
54. Zhou, C., Y. Yang, and A. Y. Jong. 1990. Mini-prep in ten minutes. Biotechniques **8**:172–173.
55. Zitzer, A., et al. 2001. Coupling of cholesterol and cone-shaped lipids in bilayers augments membrane permeabilization by the cholesterol-specific toxins streptolysin O and *Vibrio cholerae* cytotoxin. J. Biol. Chem. **276**:14628–14633.
56. Zitzer, A., O. Zitzer, S. Bhakdi, and M. Palmer. 1999. Oligomerization of *Vibrio cholerae* cytotoxin yields a pentameric pore and has a dual specificity for cholesterol and sphingolipids in the target membrane. J. Biol. Chem. **274**:1375–1380.